

DIE BEDEUTUNG VON DECTIN-1 FÜR DIE DURCH NONTYPEABLE *HAEMOPHILUS*
INFLUENZAE (NTHi) INDUZIERTER IMMUNANTWORT DES HUMANEN
LUNGENEPITHELS

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Kerstin Andrea Heyl
geboren am 04.04.1982 in Frankfurt am Main**

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Hortense Slevogt, Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. Peter Zipfel, Jena
3. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals, Homburg Saar

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.04.2014

1 Abkürzungsverzeichnis

A.dest	Destilliertes Wasser (<i>lat.</i> aqua destillata)
Bcl10	B-cell CLL/lymphoma 10
BEBM	Bronchialepithelzell-Basalmedium
BEGM	Bronchialepithelzell-Wachstumsmedium
BHI	Hirn-Herz Aufguss (<i>engl.</i> Brain heart infusion)
bp	Basenpaare
BPE	Rinderhypophysenextrakt (<i>engl.</i> Bovine pituitary extract)
Card9	<i>engl.</i> Caspase-associated recruitment domain 9
cDNA	<i>engl.</i> copy DNA
CEACAM 1	<i>engl.</i> Carcinoembryogenic antigen-related cell adhesion molecule 1
cfu	Kolonie-bildende Einheit (<i>engl.</i> colony forming units)
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
COPD	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (<i>engl.</i> Chronic obstructive pulmonary disease)
CRD	Kohlenhydrat Erkennungsdomäne (<i>engl.</i> Carbohydrate recognition domaine)
CRP	C-reaktives Protein
CT	Zyklus-Schwellenwert (<i>engl.</i> Cycle threshold)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	<i>engl.</i> Dulbeccos modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbeccos Phosphat gepufferte Salzlösung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>engl.</i> epidermal growth factor)
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (<i>engl.</i> Enzyme-linked immunosorbent assay)
F	Phenylalanin
FBS	Fetales Rinderserum (<i>engl.</i> Fetal bovine serum)

HBSM	HEPES-gepufferte Salzlösung mit Magnesium (<i>engl.</i> HEPES buffered saline with magnesium)
HBSS	HEPES gepufferte Salzlösung (<i>engl.</i> HEPES buffered saline solution)
HEK	humane embryonale Nierenzelllinie(<i>engl.</i> Human embryonal kidney)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HPRT	Hyoxanthine phosphoryltransferase1
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>engl.</i> Horse raddish peroxidase)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ITAM	<i>engl.</i> Immunoreceptor tyrosin-based activation motif
kDa	Kilo-Dalton
L	Leucin
LB	Luria Bertani
LOS	Lipooligosaccharid
Malt1	<i>engl.</i> Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
MAMP	mikrobiell-assoziierte molekulare Muster (<i>engl.</i> microbial-associated molecular patterns)
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>engl.</i> Multiplicity of infection)
mRNA	Boten RNA (<i>engl.</i> messenger RNA)
MyD88	<i>engl.</i> Myeloid differentiation primary response protein 88
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NF-κB	Nukleärer Transkriptionsfaktor κB
NHBE	primärehumane Bronchialepithelzellen (<i>engl.</i> Normal human bronchial epithelial cells)
NP-40	Nonylphenoxypolyethoxylethanol
NTHi	Nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i>
OD	Optische Dichte
OMP	Protein der äußeren Membran (<i>engl.</i> Outer membrane protein)
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (<i>engl.</i> Pathogen associated molecular pattern)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>engl.</i> Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>engl.</i> Polymerase chain reaktion)
PKCδ	Protein Kinase delta
PMSF	Phenylmethansufonylfluorid
Pol II	Polymerase II
PolyI:C	<i>engl.</i> Polyinosinic-polycytidylic acid
PP2	4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(<i>t</i> -butyl)pyrazolo[3,4- <i>d</i>]pyrimidin

RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RLU	Relative Lichteinheiten (engl. Relative light units)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase/ Reverse Transkription
RT-	Negativkontrolle in der RT zur Kontrolle des DNA-Verdaus während der RNA-Reinigung
sBHI	ergänzt BHI (engl. supplemented BHI): BHI + NAD + Hemin
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulphat
Syk	engl. Spleen tyrosine kinase
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TNS	Trypsin Neutralisationslösung (engl. Trypsin neutralizing solution)
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Y	Thyrosin

2 Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Inhaltsverzeichnis	4
3	Zusammenfassung	7
4	Einleitung	9
4.1	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)	9
4.2	Die Bedeutung des Atemwegsepithels als Bestandteil des angeborenen Immunsystems	10
4.3	Nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i>	11
4.3.1	Die Bedeutung von NTHi in COPD.....	13
4.4	Der Pathogenerkennungsrezeptor Dectin-1	15
4.4.1	Dectin-1-induzierte Signalwege in der Zelle	19
4.4.2	Die Co-Rezeptoren von Dectin-1	21
5	Ziele der Arbeit	22
6	Methodik	24
6.1	Patienten.....	24
6.2	Material	25
6.2.1	Zellkultur.....	25
6.2.2	Bakterienkultur.....	29
6.2.3	Materialien für molekularbiologische Methoden.....	32
6.2.4	Antikörper	35
6.2.5	Sonstige Puffer, Lösungen und Kits.....	36
6.2.6	Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	40
6.2.7	Geräte	41
6.3	Methoden	43

6.3.1 Zellkultur	43
6.3.2 Mikrobiologische Methoden	47
6.3.3 Molekularbiologische Methoden	49
6.3.4 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	52
6.3.5 Gewinnung und immunhistochemische Färbung humaner Lungenschnitte	53
6.3.6 Durchflusszytometrie	54
6.3.7 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	55
6.3.8 Western Blot.....	56
6.3.9 Messung der NF-κB-Aktivierung in HEK293-Zellen	58
6.4 Statistik	59
7 Ergebnisse	60
7.1 Die Expression von Dectin-1 im humanen Lungenepithel	60
7.1.1 Dectin-1 wird sowohl auf humanem Alveolar- als auch Bronchialepithel und der Pleura exprimiert.....	60
7.1.2 Die Expression von Dectin-1 ist nicht mit einer COPD-Erkrankung oder dem Raucher-Status assoziiert	62
7.1.3 Die Expression von Dectin-1 in primären Bronchialepithelzellen wird durch Interferone und TLR3 gesteigert	64
7.2 Die Bedeutung von Dectin-1 für die pro-inflammatorische Immunantwort humaner Lungenepithelzellen gegen NTHi	68
7.3 Untersuchung der beteiligten Signalwege der Dectin-1-abhängigen Immunantwort gegen NTHi in humanen Lungenepithelzellen.....	71
7.3.1 Untersuchung der Bedeutung der Isoformen Dectin-1A und Dectin-1B und der hemITAM-Signaldomäne.....	71
7.3.2 Die Bedeutung der NF-κB-Aktivierung für die NTHi-induzierte Dectin-1-Signalkaskade.....	72

7.3.3	Die Bedeutung der Syk-Kinase und des Card9/Bcl10/Malt1-Signalosoms für die Dectin-1-abhängige Immunantwort auf NTHi in humanen respiratorischen Epithelzellen.....	74
7.3.4	Die Bedeutung der Raf-1-Kinase für die NTHi-induzierte Dectin-1-Signalkaskade.....	76
7.3.5	Die Bedeutung einer Dectin-1-TLR2-Interaktion für die NTHi-induzierte Immunantwort in pulmonalen Epithelzellen	77
7.4	Untersuchung der Dectin-1-NTHi-Interaktion auf humanen pulmonalen Epithelzellen	79
8	Diskussion	81
8.1	Die Expression und Regulation von Dectin-1 auf humanem Lungenepithel	81
8.2	Die Bedeutung von Dectin-1 für die pro-inflammatorische Immunantwort gegen NTHi	85
8.3	Die Interaktion von NTHi und Dectin-1	89
9	Schlussfolgerung	92
10	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	94
11	Anhang	104
11.1	Nukleotid-Sequenzen der in NHBE-Zellen identifizierten Dectin-1 <i>Splicing</i> -Varianten.....	104
11.2	Danksagung.....	106
11.3	Ehrenwörtliche Erklärung.....	107

3 Zusammenfassung

Der *C-type-lectin-like* Rezeptor Dectin-1 ist ein wichtiger Mustererkennungs-Rezeptor (*engl.* pattern recognition receptor, PRR) des angeborenen Immunsystems mit einer extrazellulären Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne (CRD) und einer intrazellulären hemITAM-Signaldomäne (*engl.* hem immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Er bindet β -1,3-Glucane und ist in der Lage sowohl unabhängig von anderen Rezeptoren über die Syk-Kinase und das Card9-Signalosom oder die Raf-1 Kinase, als auch in Kooperation mit *Toll-like* Rezeptoren (TLR), wie z.B. TLR2, den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren und so die Expression pro-inflammatorischer Zytokine zu induzieren. Dectin-1 spielt eine wichtige Rolle in der Erkennung der respiratorischen Pathogene *Aspergillus fumigatus* (Drummond und Brown 2011) und *Mycobacterium tuberculosis* (Marakalala et al. 2010) und erste Anhaltspunkte zeigen, dass es an der Adhäsion und Phagozytose von nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) beteiligt ist (Ahren et al. 2003, Ahren et al. 2001b). NTHi ist ein Gram-negatives Pathogen des oberen Respirationstraktes, das bei Patienten mit Chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) auch den sonst sterilen unteren Respirationstrakt besiedeln kann. Interaktionen mit diesem Erreger sind eine Hauptursache für akute Exazerbationen und verstärken, durch die Induktion einer Entzündungsreaktion, die Schwere und das Fortschreiten der COPD (Eldika und Sethi 2006). In der Lunge ist das Atemwegsepithel der Ort des ersten Kontaktes zwischen Wirt und Pathogen. Es exprimiert eine Vielzahl verschiedener PRR und hat eine wichtige Funktion in der Erregererkennung und der Aktivierung des Immunsystems inne (Mizgerd 2008).

Obwohl Dectin-1 v.a. auf myeloiden Zellen beschrieben wurde, scheint es plausibel, dass epithelial exprimiertes Dectin-1 eine wichtige Rolle für die Immunantwort in der Lunge spielt. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Hypothese überprüft werden, ob Dectin-1 *in vivo* in humanem Lungenepithel exprimiert wird und welche Rolle diesem bei der Immunantwort der respiratorischen Epithelzellen gegen NTHi zukommt. Darüber hinaus sollten die zugrunde liegenden Signalwege, die bei der Interaktion von NTHi mit Dectin-1 aktiviert werden, und die Bindung von NTHi an Dectin-1 untersucht werden.

Die Expression von Dectin-1 in der humanen Lunge wurde anhand der immunhistochemischen Färbung humaner Lungenbiopsien im Hinblick auf das Vorliegen einer COPD-Erkrankung und das Tabakrauchen der Patienten geprüft. Die Regulation der Expression von Dectin-1 sowie die Bedeutung von Dectin-1 für die durch NTHi induzierte Zytokinantwort wurden an primären Bronchialepithelzellen (*engl.* normal human bronchial epithelial cells, NHBE) von gesunden Spendern untersucht. Des Weiteren wurde eine alveoläre Epithelzelllinie (A549) stabil mit den beiden Hauptisoformen Dectin-1A und Dectin-1B sowie mit einem Dectin-1A, dessen Phosphorylierungsstelle im hemITAM mutiert wurde, stabil transfiziert. Anhand dieser Zellen wurde auch die NTHi-induzierte Dectin-1-abhängige Signalkaskade und die Bindung von NTHi an Dectin-1 untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Dectin-1 auf der apikalen Seite des Lungenepithels im humanen Lungengewebe exprimiert wird. Diese Expression war nicht mit einer COPD-Erkrankung oder dem Rauchen assoziiert. Sie konnte aber in NHBE-Zellen durch Interferone induziert werden. Alle Isoformen wurden hier gleichermaßen reguliert, wobei Dectin-1B insgesamt am stärksten exprimiert wurde. Zusätzlich zu den bekannten Varianten konnte eine neue Isoform mit nicht-funktionaler Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne (CRD) identifiziert werden, deren Bedeutung jedoch nicht geklärt werden konnte. Wie anhand von Inhibitionsversuchen in NHBE-Zellen und einem A549-Dectin-1-Überexpressionsmodell gezeigt werden konnte, spielt Dectin-1A eine wichtige Rolle bei der Induktion des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-8. Dies war abhängig von der hemITAM-Signaldomäne und der Aktivität von Src-Kinasen. Die Dectin-1A-abhängige Signaltransduktion infolge einer Stimulation mit NTHi führte zur Bindung der NF- κ B-Untereinheit p65 an den IL-8-Promotor. Überraschenderweise war für die Dectin-1-abhängige IL-8 Antwort auf NTHi weder Card9, noch Raf-1 oder TLR2 essentiell. Eine direkte Adhäsion von NTHi an Dectin-1 konnte nicht nachgewiesen werden, allerdings wurde eine Bindung von NTHi an die A549-Dectin-1A, aber nicht an die Dectin-1B Zelllinie durch das Lectin Galectin-3 verstärkt.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Dectin-1 auf der apikalen Seite des Lungenepithels exprimiert wird, wo es die durch NTHi induzierte pro-inflammatorische Immunantwort verstärkt. Demnach ist es wahrscheinlich, dass die Erkennung von NTHi durch Dectin-1 auf pulmonalem Epithel einen wichtigen Beitrag für die Pathogenese von NTHi-Infektionen des unteren respiratorischen Traktes leistet.

4 Einleitung

4.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

Nach der „Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease“ (GOLD 2013) ist COPD (*engl.* chronic obstructive pneumonal disease) definiert als eine chronische Erkrankung der Lunge, die durch die fortschreitende, nicht-reversible Behinderung des Luftstromes gekennzeichnet und mit einer verstärkten, chronischen Entzündungsreaktion der Lunge auf Partikel oder Gase assoziiert ist (Murphy 2003). Hauptmerkmal ist die Limitierung des Atemstromes, insbesondere während der Expiration, die anhand der Abnahme des forcierten expiratorischen Volumens in der ersten Ausatemungssekunde (FEV_1) quantifiziert wird. Diese Abnahme wird durch die chronische Entzündung der Atemwege verursacht, die zu einer zunehmenden Verengung der Bronchiolen führt. Häufig kommt es zusätzlich zu einem Lungenemphysem. Hauptsächliche Symptomatik der Erkrankung sind ein chronischer Husten und eine Dyspnoe.

Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist COPD derzeit die vierthäufigste Todesursache weltweit. Ihre Häufigkeit wird voraussichtlich weiter zunehmen und 2030 vermutlich die dritthäufigste Todesursache sein (WHO 2008). Diese Zunahme ist begründet durch eine Langzeit-Exposition der Menschen mit Risikofaktoren der COPD und der längeren Lebensdauer der Weltbevölkerung (Mathers und Loncar 2006). Die Entwicklung einer COPD ist ein multifaktorieller pathologischer Prozess, der sich über mehrere Dekaden entwickelt und bei dem der genetische Hintergrund und Umweltbedingungen zusammenspielen (Decramer et al. 2012). Der Hauptrisikofaktor an COPD zu erkranken ist das Tabakrauchen. Aber auch andere Umweltfaktoren wie das Passiv-Rauchen, Luftverschmutzung und Asthma oder häufige respiratorische Erkrankungen im Kindesalter können die Entwicklung einer COPD begünstigen. Tabakrauch kann das respiratorische Epithel direkt schädigen und Entzündungsreaktionen hervorrufen. So beeinträchtigt er die Integrität des Epithels als physikalische Barriere, erhöht die Permeabilität des Epithels, beschädigt die mukoziliäre Reinigung und kann die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch die Epithelzellen induzieren (Stampfli und Anderson 2009). Infolgedessen kommt es zu einem Einstrom und der Aktivierung von Entzündungszellen wie Makrophagen, Neutrophilen und Dendritischen Zellen, die durch die Freisetzung

proteolytischer Enzyme und reaktiver Sauerstoffspezies die Schädigung des respiratorischen Gewebes weiter vorantreiben (Barnes et al. 2003, Demedts et al. 2007, Rahman und Adcock 2006). Während des chronischen und fortschreitenden Verlaufs der COPD kommt es in regelmäßigen Abständen zu sogenannten Exazerbationen, kurzen Intervallen mit intensivierter Inflammation, während der die charakteristischen Symptome und Beschwerden wie Husten, Atemnot und die Produktion von Sputum verstärkt auftreten. Exazerbationen vermindern die Lebensqualität, beschleunigen den Krankheitsverlauf und erhöhen das Mortalitätsrisiko (Decramer et al. 2012). Die Häufigkeit mit der solche Exazerbationen auftreten, nimmt mit der Schwere der COPD-Erkrankung zu. Hervorgerufen werden diese meist durch bakterielle und virale Infektionen, wobei NTHi der häufigste Verursacher von bakteriell bedingten Exazerbationen ist (Moghaddam et al. 2011, Murphy 2006).

4.2 Die Bedeutung des Atemwegsepithels als Bestandteil des angeborenen Immunsystems

Das pulmonale Epithel bildet eine riesige Grenzfläche zwischen dem inneren Milieu des menschlichen Organismus und der Umwelt. Es ist somit der Ort des ersten Kontaktes zwischen eindringenden pathogenen Mikroorganismen und dem Wirt und stellt eine erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene dar (Bals und Hiemstra 2004, Gomez und Prince 2008). Dabei erfüllt das Epithel eine Funktion als mechanische Barriere: Es bildet einen kontinuierlichen, über *tight junctions* verankerten Zellverband und das aus Zilien tragenden Zellen und Mukus produzierenden Becherzellen bestehende tracheobronchiale Epithel ermöglicht eine mukoziliäre Reinigung (Hippenstiel et al. 2006, Mayer und Dalpke 2007). Darüber hinaus dient das Lungenepithel als „Wächtersystem“, um Pathogene, die in die Atemwege eindringen, zu erkennen und daraufhin die initiale Immunantwort des Wirtes zu induzieren (Bals und Hiemstra 2004, Evans et al. 2010, Gomez und Prince 2008, Hippenstiel et al. 2006, Kato und Schleimer 2007, Mayer und Dalpke 2007). Zu diesem Zweck exprimieren die Epithelzellen eine Reihe verschiedener transmembraner und intrazellulärer Muster-Erkennungsrezeptoren (*engl.* pattern recognition receptors, PRR), mit deren Hilfe hoch konservierte mikrobielle Strukturen, sogenannte MAMPs (*engl.* microbial-associated molecular patterns), in der Literatur häufig

auch als PAMPs (*engl.* pathogen-associated molecular patterns) bezeichnet (Kawai und Akira 2010, Plate et al. 2013), erkannt werden. Die Aktivierung dieser PRR löst in den Epithelzellen verschiedene Signalkaskaden aus, die eine Expression von antimikrobiellen Peptiden, Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Epithelzellen und inflammatorischen Mediatoren wie Chemokine und Zytokine, z.B. Interleukin-8 (IL-8) oder Interleukin-6 (IL-6) induzieren (Bals und Hiemstra 2004, Hippenstiel et al. 2006, Kato und Schleimer 2007, Mizgerd 2008). Mit Hilfe dieser Mediatoren werden andere Zellen des Immunsystems aktiviert und phagozytierende Zellen, wie Neutrophile und Makrophagen, rekrutiert. Zum Beispiel IL-8 besitzt eine starke chemotaktische Wirkung und spielt bei der Migration von Neutrophilen zum Infektionsort eine zentrale Rolle (Baggiolini 1998, Huber et al. 1991, Underhill et al. 2005), während IL-6 ebenfalls als wichtiges Zytokin in der angeborenen Immunantwort und in der Entwicklung einer adaptiven Immunantwort beschrieben wurde (Jones 2005, Rincon und Irvin 2012). Die Aktivierung der Epithelzellen selbst kann wiederum durch Mediatoren, die von anderen Zellen des Immunsystems sekretiert werden, reguliert werden (Mizgerd 2008). Insgesamt sind die respiratorischen Epithelzellen also wichtige Effektorzellen für die Induktion und Regulation lokaler Immunantworten.

4.3 Nontypeable *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae sind Gram-negative Bakterien, die den respiratorischen Trakt des Menschen besiedeln. Die Gattung wird definiert anhand ihres essentiellen Bedarfs an β -Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) und Hämin, welches sie aus Hämoglobin oder Hämoglobin-Haptoglobin akquirieren können. Man kann anhand der Polysaccharid-Kapsel sechs verschiedene Serotypen unterscheiden (A-F). Am bekanntesten ist hierbei *H. influenzae* Typ b, der als gefürchtete Komplikation Meningitis verursachen kann. Mit Hilfe eines Epitops der Polysaccharidkapsel als Vakzin konnten HIB-Infektionen drastisch eingeschränkt werden (Nascimento-Carvalho und de Andrade 2006, Slack et al. 1998). Des Weiteren gibt es *H. influenzae* denen eine solche Kapsel fehlt. Diese werden als „nicht-typisierbare“ (*engl.* nontypeable) *Haemophilus influenzae* (NTHi) bezeichnet, und gegen diese Erreger existiert bisher noch kein Vakzin. Obwohl NTHi meist mit einer asymptomatischen Kolonisierung des oberen Respirationstraktes assoziiert sind, spielen sie auch als Erreger von Erkrankungen des Respirationstraktes eine wichtige Rolle (Erwin und Smith 2007). So ist der Keim ein wichtiger Erreger von Otitis media bei Kindern und

verursacht Sinusitis bei Kindern und Erwachsenen und Pneumonien bei älteren Menschen und Menschen mit Lungenvorschaden. Überdies verursacht NTHi Infektionen des unteren Respirationstraktes in Patienten mit COPD, wo es noch vor *Streptococcus pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis* die häufigste Ursache bakteriell bedingter Exazerbationen ist (Eldika und Sethi 2006, Moghaddam et al. 2011, Murphy 2003, Murphy 2006,).

Essentiell für die Kolonisierung und nachfolgende Pathogenese von NTHi ist zunächst eine erfolgreiche Adhäsion der Bakterien an nicht-ziliäre respiratorische Epithelzellen oder Bereiche mit beschädigtem Epithel, um der mukoziliären Reinigung der Atemwege zu entgehen (St Geme 2002). Zu diesem Zweck exprimiert NTHi auf seiner Oberfläche eine Reihe verschiedener Strukturen, sogenannte Adhäsine (St Geme 2002): So exprimieren z.B. einige NTHi-Stämme kurze filamentöse Strukturen, sogenannte Fimbrien oder Pili, die der Adhäsion an Wirtszellen oder Mucin dienen. Außerdem konnte für die Proteine Hap und Hia, die „*high molecular weight*“ Adhäsine HMW1 und HMW2, das Lipoprotein OapA, das *Outer Membrane Protein 5* (OMP5) und das Lipooligosaccharid eine Rolle in der Adhäsion der Bakterien an Wirtszellen nachgewiesen werden. In der weiteren Pathogenese produziert NTHi keine Toxine, die den Wirt aktiv schädigen. Stattdessen wird seine Pathogenität vielmehr durch die Induktion einer spezifischen Immunantwort bestimmt. So können verschiedene Strukturen von NTHi Rezeptoren der Wirtszellen binden und so eine pro-inflammatorische Immunantwort induzieren oder modulieren. Das Protein der äußeren Membran OMP6 wird beispielsweise durch *Toll-like-Rezeptor 2* (TLR2) erkannt, was die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen bewirkt (Chen et al. 2004, Lugade et al. 2011). OMP5 dagegen kann an CEACAM1 (*engl. carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*), binden (Bookwalter et al. 2008, Hill et al. 2001). Diese Bindung dient nicht nur der Adhäsion, sondern auch der Modulation der induzierten Immunantwort, denn es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von CEACAM1 zu einer Inhibition der TLR2-spezifischen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt (Slevogt et al. 2008b). Eine wichtige Rolle bei der Induktion einer pro-inflammatorischen Immunantwort spielt das Lipooligosaccharid (LOS) von NTHi, das eine TLR4-spezifische Immunantwort induziert (Ahren et al. 2001a, Wieland et al. 2005). Im Gegensatz zu dem Lipopolysaccharid (LPS) vieler anderer Gram-negativer Bakterien hat das LOS von NTHi keine lange, verzweigte O-spezifische Seitenkette aus sich wiederholenden Oligosacchariden, sondern verfügt stattdessen nur aus sich nicht wiederholenden

Oligosacchariden, die mit der Kernregion und LipidA verknüpft sind. Die Zusammensetzung dieser Oligosaccharide ist von Molekül zu Molekül hoch variabel (Masoud et al. 1997, Preston et al. 1996, Risberg et al. 1999, Schweda et al. 2003). Es konnte auch gezeigt werden, dass NTHi in der Lage ist, Cholin des Wirtes als Phosphorylcholin in sein LOS einzubauen (Fan et al. 2001). Mit Hilfe des Phosphorylcholins kann NTHi an den PAF-Rezeptor binden (Swords et al. 2000, Swords et al. 2001). Dies führt zu einer Aktivierung der PI3-Kinase, die in der Lage ist TLR2-, TLR4- und TLR9-spezifische Signalkaskaden zu inhibieren (Fukao und Koyasu 2003).

NTHi-Stämme sind genetisch und phänotypisch sehr divers. Welche Adhäsine und Pathogenitätsfaktoren von NTHi exprimiert werden, kann sich zwischen verschiedenen Stämmen stark unterscheiden, was nahelegt, dass sich verschiedene Stämme auch in ihrer Pathogenität unterscheiden können (Erwin und Smith 2007). Zusätzlich unterliegen viele der entsprechenden Gene der Phasenvariation (Erwin und Smith 2007). Dies ist ein Mechanismus, mit dem die Expression von Genen zufällig an- oder ausgeschaltet werden kann, was zu einer phänotypisch heterogenen Bakterienpopulation führt und eine bessere Adaption an verschiedene und wechselnde Umweltbedingungen ermöglicht (Henderson et al. 1999). Es bietet außerdem einen Schutz vor Antigen-spezifischen Immunantworten.

4.3.1 Die Bedeutung von NTHi in COPD

Während der obere Respirationstrakt bis zur Bifurkation der Bronchien mit Bakterien besiedelt ist, sind die unteren Atemwege des Lungengesunden steril. Bei Rauchern und COPD-Patienten dagegen kommt es oft zu einer pathologischen Kolonisierung der unteren Atemwege durch bakterielle Pathogene, insbesondere NTHi (Eldika und Sethi 2006, Moghaddam et al. 2011). Die Fähigkeit von NTHi während einer COPD-Erkrankung im unteren Respirationstrakt zu persistieren wird vermutlich durch mehrere Faktoren vermittelt: Zum Beispiel erleichtert die in Rauchern und COPD-Patienten zu beobachtende Störung der mukoziliären Reinigung die Adhäsion der Bakterien (Stampfli und Anderson 2009). Des Weiteren ist die Phagozytose von NTHi durch alveoläre Makrophagen durch die COPD beeinträchtigt (Berenson et al. 2006). Die in NTHi zu beobachtende Antigenvariation des OMP2 (Duim et al. 1994, Duim et al. 1996, Hiltke et al. 2003) sowie die Phasenvariation verschiedener Virulenzfaktoren sind Mechanismen der Immunevasion.

Zudem können die Erreger in die Epithelzellen eindringen, was einen gewissen Schutz vor Antibiotika und spezifischen Antikörpern bietet (van Schilfgaarde et al. 1999).

Die durch eine Kolonisierung bedingte persistente Exposition der Atemwege mit NTHi und NTHi-Produkten trägt zu der chronischen Entzündung und der daraus resultierenden Zunahme der Obstruktion der Atemwege bei. So ist NTHi in der Lage Lungenepithelzellen zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-8, IL-6 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) anzuregen (Moghaddam et al. 2011). Durch die Ausschüttung dieser pro-inflammatorischen Zytokine kommt es zur Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Dabei spielt vor allem die Einwanderung und Aktivierung von Neutrophilen eine wichtige Rolle bei der entzündungsbedingten Gewebeschädigung, die während der COPD beobachtet werden kann (Eldika und Sethi 2006, Moghaddam et al. 2011).

Interaktionen mit NTHi kommen im Verlauf der COPD eine wichtige Rolle zu. Während Exazerbationen konnte NTHi in verschiedenen Studien besonders häufig im unteren Respirationstrakt nachgewiesen werden (Eldika und Sethi 2006): Monso et al. (Monso et al. 1995) konnten einen Anstieg des Nachweises von NTHi in den bronchioskopischen Proben von 15% der Patienten mit stabiler COPD auf bis zu 37% von Patienten mit Exazerbationen nachweisen. In einer Studie von Bandi et al. konnte NTHi in den Bronchien von 87% der Patienten mit Exazerbationen und von 33% der Patienten mit stabiler COPD nachgewiesen werden, während in gesunden Nichtrauchern keine NTHi gefunden wurden (Bandi et al. 2001). Zudem ist die Kolonisierung der unteren Atemwege mit NTHi auch mit einer erhöhten Häufigkeit und einem schwereren Verlauf der Exazerbationen verknüpft (Patel et al. 2002). Während der Exazerbationen führt die Anwesenheit von NTHi zu einer besonders intensiven Entzündungsreaktion. So war in der Studie von Sethi et al. der Level der pro-inflammatorischen Zytokine IL-8 und TNF α im Sputum von Patienten mit einer Exazerbation deutlich höher, wenn gleichzeitig eine NTHi-Infektion nachgewiesen werden konnte (Sethi et al. 2000).

Interessanterweise konnte in einer weiteren Studie von Sethi et al. der Erwerb eines neuen NTHi-Stammes mit einem erhöhten Risiko einer Exazerbation assoziiert werden (Sethi et al. 2002). Vermutlich wird dies durch eine fehlende spezifische Immunantwort gegen den neu erworbenen Stamm bedingt, was die Vermehrung der Bakterien ermöglicht und folglich in

einer verstärkten Inflammation mit den klinischen Symptomen einer Exazerbation resultieren kann. Übereinstimmend damit konnte gezeigt werden, dass die Antikörper, die zu einem späteren Zeitpunkt einer Exazerbation gebildet wurden, sehr stamm-spezifisch sind (Sethi et al. 2004). Verschiedene NTHi-Stämme sind genetisch und phänotypisch sehr heterogen. Das legt die Vermutung nahe, dass sich die einzelnen Stämme in ihrer Pathogenität deutlich unterscheiden können. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass NTHi, die aus dem Sputum von Patienten mit COPD-Exazerbation isoliert wurden, respiratorische Epithelzellen stärker aktivierten als NTHi-Stämme aus asymptomatischen Infektionen (Chin et al. 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine pathologische Kolonisation sowie akute Infektionen mit NTHi im unteren Respirationstrakt durch die Induktion einer pro-inflammatorischen Immunantwort maßgeblich zu einer fortschreitenden Schädigung der Lunge im Verlauf der COPD beitragen.

4.4 Der Pathogenerkennungsrezeptor Dectin-1

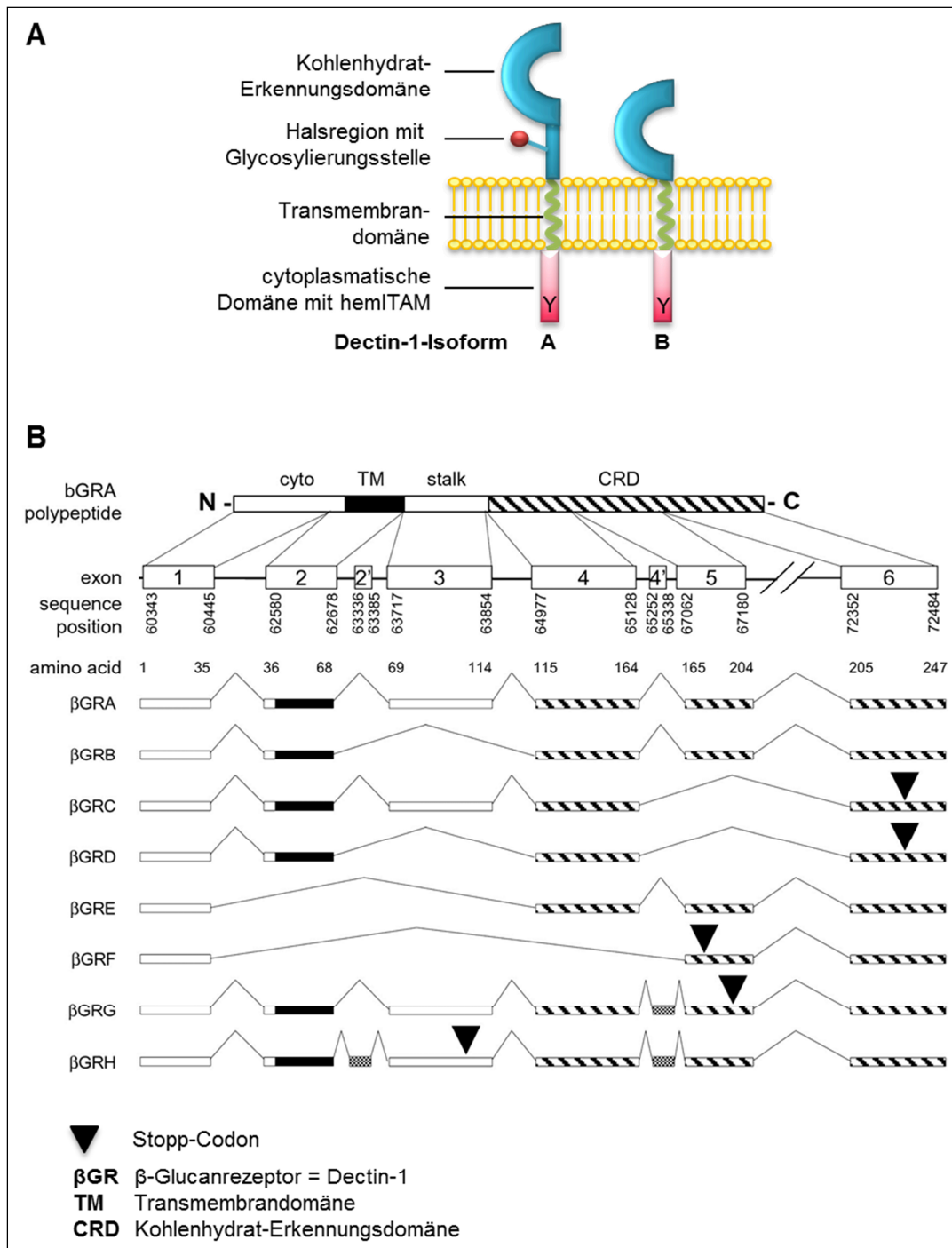
Dectin-1 (*engl.* Dendritic cell-associated C-type lectin 1) ist ein Typ II Transmembranprotein der Gruppe V der *C-type lectin-like* Rezeptoren. Es enthält eine Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne (*engl.* carbohydrate recognition domain, CRD) in seiner extrazellulären Domäne, mit der es β -1,3-Glucane, ein wichtiger Bestandteil der Zellwand von Pilzen, binden kann. Dectin-1 wird daher als sogenannter Muster-Erkennungs-Rezeptor (*engl.* pattern recognition receptor, PRR) klassifiziert (Brown 2006). PRRs sind Proteine, die dem angeborenen Immunsystem zur Erkennung von Pathogenen anhand konservierter molekularer Muster (*engl.* microbial-associated molecular patterns, MAMPs) dienen. Die Bindung der β -1,3-Glucane ist abhängig von der Kettenlänge und dem Grad der Verzweigung (Adams et al. 2008). Auch wenn Dectin-1 *in vitro* als Monomer vorliegt, legen kristallographische Daten nahe, dass Dectin-1 in Gegenwart des β -1,3-Glucans Laminarin Oligomere bildet (Brown et al. 2007).

Nach der Ligandenbindung kann Dectin-1 mit Hilfe seiner zytoplasmatischen hemITAM-Domäne, auch ITAM-like genannt, über verschiedene Signalwege die Expression von Zytokinen oder Phagozytose induzieren (siehe Kapitel 4.4.1). Dectin-1 kommt eine wichtige Rolle für die Erkennung verschiedener Pilzspezies wie *Candida* (Gantner et al.

2005), *Aspergillus*(Steele et al. 2005), *Coccidioides*(Viriyakosol et al. 2005), *Pneumocystis*(Steele et al. 2003) und *Saccharomyces*(Brown und Gordon 2003) zu. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Dectin-1 einen bislang unbekannten Liganden von *Mycobakteria*, u.a. *M. tuberculosis*, erkennt (Lee et al. 2009b, Rothfuchs et al. 2007, Shin et al. 2008, Yadav und Schorey 2006). Überdies zeigte Áhren et al. in zwei Studien, dass die Adhäsion an und die Phagozytose von NTHi durch Monozyten, eosinophile Granulozyten und die alveoläre Zelllinie A549 durch einen β -Glucan-Rezeptor beeinflusst wird, dessen Aktivität durch Laminarin inhibiert werden kann (Ahren et al. 2001b, Ahren et al. 2003). Dabei vermuten die Autoren, dass es sich um Dectin-1 handelt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Dectin-1 auch einen endogenen Liganden, der auf T-Zellen exprimiert wird, bindet (Ariizumi et al. 2000, Grunebach et al. 2002). An dieser Bindung scheint allerdings die CRD nicht beteiligt zu sein (Willment et al. 2001). All dies legt die Vermutung nahe, dass Dectin-1 ein umfangreicheres Ligandenspektrum detektieren kann als bisher angenommen und nicht nur während der Immunantwort gegen Pilzinfektionen von Bedeutung sein könnte.

Dectin-1 wird vor allem auf myeloiden Zellen exprimiert. Es konnte im Menschen auf der Oberfläche von Monozyten, ungereiften von Monozyten abgeleiteten Dendritischen Zellen, Eosinophilen, Neutrophilen, B-Lymphozyten und CD4+ T-Zellen nachgewiesen werden (Willment et al. 2005). Darüber hinaus wurde Dectin-1 mRNA in der Milz, dem Knochenmark, dem Thymus und der Lunge detektiert (Lech et al. 2012, Willment et al. 2001). Die Expression von Dectin-1 in der humanen Lunge wurde bislang, außer dem Nachweis von RNA im Gesamtorgan-Homogenisat, nicht näher charakterisiert. In Mäusen hingegen wurde in Lungengewebe die Expression von Dectin-1 mRNA im Bronchial- und Alveolarepithel nachgewiesen (Rand et al. 2010). Inwiefern Dectin-1 auf der Oberfläche von primären humanen Lungenepithelzellen bzw. im humanen Lungengewebe exprimiert wird, ist *in vivo* noch nicht untersucht worden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Expression von Dectin-1 *in vitro* in humanen Lungenepithelzelllinien induziert werden konnte: So zeigten Lee et al.(Lee et al. 2009a), dass Dectin-1 in der alveolären Epithelzelllinie A549 durch Stimulation mit *M. tuberculosis* in Abhängigkeit von TLR2 induziert werden kann, während in der Studie von Sun et al.(Sun et al. 2012) kürzlich gezeigt wurde, dass eine Inkubation mit *Aspergillus fumigatus* die Expression von Dectin-1 in einer mit Papillomavirus immortalisierten Bronchialepithelzelllinie induziert.

Insgesamt sind von Dectin-1 bisher acht Isoformen bekannt, die durch alternatives *Splicing* des Dectin-1-Gens *CLEC7A* entstehen (Willment et al. 2001). Sie werden in Abbildung 1 dargestellt. Die beiden Hauptisoformen Dectin-1A und Dectin-1B sind die einzigen Varianten, für die eine Bindung von β -Glucan (in Form von Zymosan, einer Zellwand-Präparation von *Saccharomyces cerevisiae*) nachgewiesen werden konnte (Willment et al. 2001). Dectin-1A besteht aus allen sechs Exons des Gens *CLEC7A*. Es verfügt damit über die CRD, eine Halsregion mit Glykolysierungsstelle, eine Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Domäne, die die hemITAM-Domäne enthält (siehe Abbildung 1). Der Isoform Dectin-1B hingegen fehlt die Halsregion (Exon 3). Sie ist daher nicht glykolysiert. Den anderen Isoformen fehlen entweder weitere Exons oder sie enthalten kleine Insertionen, die ein vorzeitiges Stoppcodon enthalten und so ein verkürztes Protein codieren. Diese Isoformen können kein Zymosan binden (Willment et al. 2001). Eine Ausnahmestellung nimmt Isoform Dectin-1E ein. Diese besteht nur aus dem zytoplasmatischen Teil des Proteins. Sie kommt daher nur intrazellulär vor, wo sie das mikrotubuläre Ran-Bindeprotein (RanBPM) bindet, das mit der kleinen GTPase Ran interagieren kann (Xie et al. 2006). Für die Isoformen Dectin-1C, Dectin-1D und Dectin-1F bis Dectin-1H ist kein Ligand bekannt. Ihre Funktion ist bisher ungeklärt.



4.4.1 Dectin-1-induzierte Signalwege in der Zelle

Nach der Bindung eines Liganden an Dectin-1 kommt es zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege, die die Produktion verschiedener Chemokine und Zytokine sowie Phagozytose und die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle (*engl.* oxidative burst) induzieren (Plato et al. 2013, Reid et al. 2009). Essentiell für die Funktion von Dectin-1 ist die hemITAM-Domäne in seinem zytoplasmatischen Teil. Im Gegensatz zum klassischen ITAM mit zwei Phosphorylierungsstellen (YxxL.....YxxL) enthält das hemITAM von Dectin-1 nur eine Phosphorylierungsstelle (Tyrosin 15), die von Kinasen der Src-Familie phosphoryliert wird und an die die Kinase Syk (*engl.* spleen tyrosine kinase) rekrutiert wird (Plato et al. 2013, Reid et al. 2009, Rogers et al. 2005). Nach bisherigem Kenntnisstand werden für eine Bindung von Syk zwei Phosphorylierungsstellen benötigt. Wie diese Bindung an Dectin-1 mit nur einer Phosphorylierungsstelle ermöglicht wird, ist bislang noch nicht geklärt, es wird aber vermutet, dass an der Syk-Bindung jeweils zwei Dectin-1 Moleküle beteiligt sind (Rogers et al. 2005). Infolge der Syk-Rekrutierung wird über die Protein-Kinase δ (PKC δ) Card9 (*engl.* caspase recruitment domain family member 9) aktiviert, dass einen Komplex mit Bcl10 (*engl.* B cell lymphoma 10) und Malt1 (*engl.* mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1) bildet. Dies führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Gross et al. 2006). Infolgedessen kommt es nach Translokation der NF- κ B Untereinheiten p65 und REL (bzw. der Dimere p65-p50 und REL-p50) in den Nukleus, wo sie die Expression verschiedener Zytokine induzieren (Geijtenbeek und Gringhuis 2009). Zusätzlich zu dieser sogenannten „kanonischen“ oder klassischen NF- κ B Aktivierung kann durch Dectin-1 und Syk auch der „nicht-kanonische“ Weg aktiviert werden (siehe Abbildung 2). Dabei kommt es zur nukleären Translokation von RELB-p52 Dimeren, die die Transkription verschiedener Zytokine inhibieren, die eine Rolle in der T-Helferzell-Differenzierung spielen (Gringhuis et al. 2009).

Unabhängig von Syk kann Dectin-1 darüber hinaus noch einen weiteren Signalweg über die Kinase Raf-1 induzieren (Abbildung 2). Dieser führt parallel zu dem kanonischen und nicht-kanonischen Signalweg zu einer Aktivierung von NF- κ B (Geijtenbeek und Gringhuis 2009, Gringhuis et al. 2009): Durch die Phosphorylierung von p65 (an Serin276) und dessen nachfolgender Azetylierung wird die Affinität von p65 zur DNA erhöht und dadurch seine transkriptionelle Aktivität verstärkt. Außerdem kann acetyliertes p65 REL am

Promotor verschiedener Gene ersetzen, wodurch die Transkription je nach Gen verstärkt oder verringert werden kann. Zusätzlich zu dieser synergistischen Aktivierung von p65 durch den Syk- und den Raf-1-abhängigen Signalweg kommt es zu einer Feinabstimmung der Expression verschiedener Zytokinantworten durch ein Verlinken der kanonischen und nicht-kanonischen NF- κ B Aktivierung, indem das acetylierte p65 in der Lage ist, RELB zu binden. Die so entstandenen p65-RELB-Dimere haben keine transkriptionelle Aktivität und inhibieren die Funktion von RELB-p52, wodurch die T-Helferzelldifferenzierung und somit die induzierte adaptive Immunantwort modifiziert wird (Gringhuis et al. 2009).

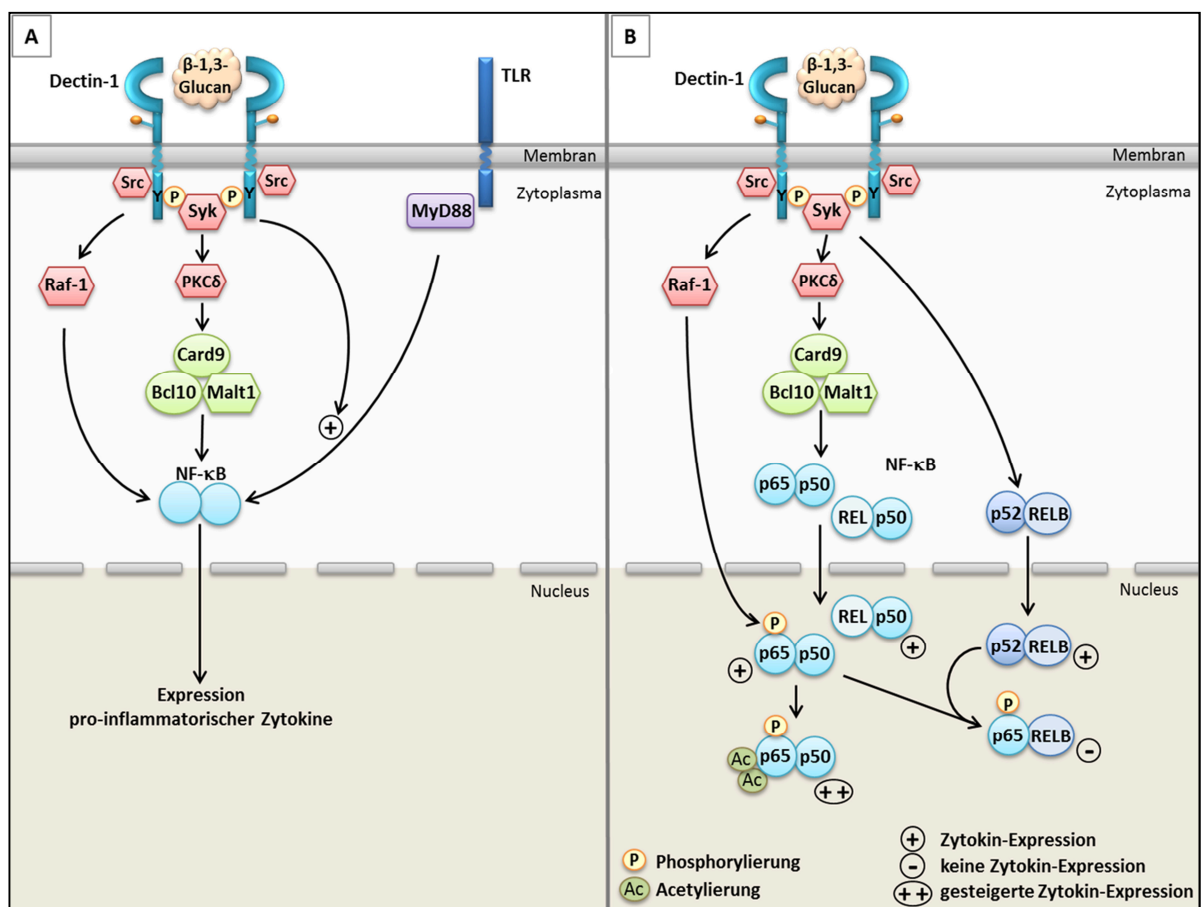


Abbildung 2: Dectin-1-induzierte Signalwege (modifiziert nach Geijtenbeek und Gringhuis 2009). [A] Übersicht der Wege, die zur NF- κ B-Aktivierung führen. [B] Detaillierte Darstellung der NF- κ B-Aktivierung

4.4.2 Die Co-Rezeptoren von Dectin-1

Dectin-1 kann funktional auch mit anderen Rezeptoren wie z.B. MyD88 (*engl.* myeloid differentiation primary response protein 88)-abhängigen *Toll-like*-Rezeptoren wie TLR2 und TLR4 kollaborieren (Dennehy et al. 2008, Dennehy et al. 2009, Gantner et al. 2003, Gringhuis et al. 2009) (Abbildung 2). Die zugrunde liegenden Signalwege sind bisher noch nicht vollständig geklärt.

Eine Kolokalisation konnte darüber hinaus mit TLR2, den *C-type-lectin* Rezeptoren DC-SIGN und Mannose-Rezeptor und den Tetraspaninen CD63 und CD37 nachgewiesen werden (Mantegazza et al. 2004, Meyer-Wentrup et al. 2007, Shin et al. 2008, Valera et al. 2008).

Ein weiterer Co-Rezeptor von Dectin-1 ist Galectin-3, ein Lectin der Galectin-Familie. Es enthält eine C-terminale Kohlenhydrat-Binde-Domäne (CRD) und eine N-terminale Domäne, die der Oligomerisierung dient. Es kann sowohl intrazellulär vorliegen als auch sekretiert werden. Nach der Bindung eines Liganden kann Galectin-3 über die N-terminale Bindedomäne Oligomere bilden und auf diese Weise verschiedene Zuckerstrukturen an der Zelloberfläche miteinander vernetzen (Henderson und Sethi 2009, Ahmad et al. 2004). Galectin-3 spielt eine vielfältige Rolle in akuter Inflammation (Henderson und Sethi 2009) und kann verschiedene Saccharidstrukturen pathogener Mikroorganismen binden. So bindet es z.B. Mycolsäuren von *Mycobacterium* Spezies (Barboni et al. 2005), das Lipopolysaccharid der Gram-negativen Bakterien *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella minnesota* und *Escherichia coli* (Fermino et al. 2011, Fowler et al. 2006, Gupta et al. 1997, John et al. 2002, Mey et al. 1996, Quattroni et al. 2012) und β -1,2-Mannoside von *C. albicans* (Fradin et al. 2000, Kohatsu et al. 2006). Esteban et al. (Esteban et al. 2011) konnten nachweisen, dass Galectin-3 an Dectin-1 bindet und eine wichtige Rolle in der Dectin-1-abhängigen Immunantwort hat, die durch *C. albicans* induziert wird.

5 Ziele der Arbeit

Dectin-1 ist ein Mustererkennungsrezeptor (PRR), der eine bedeutende Rolle in der Immunantwort gegen pathogene Pilze wie *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* spielt, indem er β -1,3-Glucane der Zellwand der Pilze erkennt und daraufhin eine pro-inflammatorische Immunantwort induziert (Drummond und Brown 2011). Zusätzlich ist Dectin-1 auch für die Immunantwort gegen *Mycobacterium tuberculosis* von Bedeutung, wobei der verantwortliche Ligand noch unbekannt ist (Marakalala et al. 2010). Darüber hinaus gibt es erste Hinweise, dass Dectin-1 auch in der Adhäsion und Phagozytose von NTHi, einem wichtiger Erreger des unteren Respirationstraktes in der Pathogenese von COPD, eine Rolle spielt (Ahren et al. 2001b, Ahren et al. 2003). Da sowohl *A. fumigatus* als auch *M. tuberculosis* und NTHi wichtige Pathogene des respiratorischen Traktes darstellen, ist zu vermuten, dass Dectin-1 in der Immunabwehr der Lunge eine wichtige Funktion innehat. In der Lunge bildet das Epithel eine natürliche Barriere zwischen der Atemluft und dem Körper und ist somit der Ort des ersten Kontaktes zwischen Pathogenen und dem Wirtsorganismus. Die Lungenepithelzellen exprimieren deshalb eine Reihe verschiedener PRR, was sie zu einer Erkennung von pathogenen Mikroorganismen zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion befähigt und infolgedessen die Aktivierung des Immunsystems durch die Sekretion verschiedener Chemokine ermöglicht (Mizgerd 2008). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch Dectin-1 auf Lungenepithelzellen exprimiert wird und hier eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Immunsystems spielen könnte. Bisher wurde es allerdings überwiegend auf myeloiden Zellen beschrieben. Auch wenn in zwei Studien gezeigt werden konnte, dass Dectin-1 *in vitro* in Lungenepithelzelllinien induziert werden kann (Lee et al. 2009a, Sun et al. 2012), ist die Expression und die Regulation der Expression von Dectin-1 in der humanen Lunge *in vivo* bislang nicht untersucht worden. Deshalb soll in dieser Arbeit die Expression von Dectin-1 in den verschiedenen Geweben der humanen Lunge und deren Regulation durch COPD oder Tabakrauchen charakterisiert werden. Dazu standen immunhistochemisch gefärbte Lungenschnitte von 19 Patienten mit und ohne COPD und aus Rauchern und Nichtrauchern zu Verfügung, die sich aufgrund einer Krebserkrankung einer Lungensektion unterziehen mussten. Außerdem wurde die Regulation von Dectin-1 *in vitro* in primären Bronchialepithelzellen untersucht.

In der Pathogenese von COPD spielt die pathologische Kolonisation und akute Infektion mit NTHi durch die Induktion einer pro-inflammatorischen Immunantwort eine wichtige Rolle. Deshalb soll die Hypothese überprüft werden, dass Dectin-1 auf Lungenepithel exprimiert wird und für die durch NTHi induzierte Immunantwort von Bedeutung ist. Folgende Fragen sollen dabei adressiert werden:

- 1.) Welches Expressionsprofil zeigt Dectin-1 in der humanen Lunge und sind Assoziationen zu COPD und Rauchen zu beobachten?
- 2.) Wie wird die Expression von Dectin-1 in NHBE-Zellen reguliert?
- 3.) Wie funktioniert die Interaktion von Dectin-1 und NTHi hinsichtlich der Ligandenbindung und der induzierten Signalwege?

Insgesamt soll diese Arbeit zum besseren Verständnis der Lokalisation und der Regulation der Dectin-1-Expression in der humanen Lunge und deren Bedeutung für die Immunantwort gegen NTHi beitragen.

6 Methodik

6.1 Patienten

Die Lungensektionen von 19 Patienten wurden in der Chirurgie der Thoraxklinik am Universitätsklinikum Heidelberg (Amalienstraße 5, 69126 Heidelberg) von Prof. Dr. med. Hendrik Dienemann und Dr. med. Christiane Grünewald entnommen und uns in Kooperation mit Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals (Klinik für Innere Medizin V – Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin, Universitätsklinikum des Saarlandes, Kirrbergerstraße 1, 66421 Homburg Saar) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Sektionen wurden aufgrund einer Erkrankung an Lungenkrebs vorgenommen. Das hier untersuchte Lungengewebe stammt dabei aus nicht-tumorösen Bereichen.

Einverständniserklärungen der Patienten wurden jeweils erteilt und die Erlaubnis der Ethikkommission der Universität Heidelberg wurde eingeholt.

Die Patienteneigenschaften sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Patienteneigenschaften

Geschlecht (männlich/weiblich)	9 / 10
Alter (in Jahren; Mittelwert \pm SD)	63 (\pm 11)
Raucher / Ex-Raucher / Nichtraucher	5 / 11 / 3
Packungsjahre* (Raucher / Ex-Raucher / Nichtraucher; Mittelwert \pm SD)	61(\pm 22) / 33(\pm 22) / 0
COPD/keine COPD	8 / 11
C-reaktives Protein (in dg/ml; Mittelwert \pm SD)	20,6 (\pm 32,7)

* täglich gerauchte Zigarettenpackungen multipliziert mit der Anzahl der Jahre als Raucher

6.2 Material

Bei allen in diesem Kapitel nicht aufgeführten Chemikalien handelt es sich um in Laboratorien standardmäßig eingesetzte Substanzen, welche alle den analytischen Reinheitsgraden entsprechen und von den Firmen Sigma Aldrich GmbH oder Carl Roth GmbH bezogen wurden.

6.2.1 Zellkultur

6.2.1.1 Primäre humane Bronchialepithelzellen

Die NHBE-Zellen (*engl.* Normal Human Bronchial Epithelial Cells) wurden von der Firma Lonza (Lonza Group Ltd., Basel) erworben und stammen von gesunden, auf HIV-1- und Hepatitis B/C-negativ-getesteten Spendern. Zur Anwendung kamen Zellen der Lotnummern 6F3918, 215371, 210894, 226898, 4F1289J und 75008.

6.2.1.2 Humane alveoläre Adenocarcinom Zelllinie A549

Die Zelllinie A549 wurde 1972 aus dem Lungenadenokarzinom eines 58 Jahre alten kaukasischen Mannes isoliert. Es handelt sich morphologisch um eine alveoläre Basalepithelzelle. Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen (Nummer ACC 107).

6.2.1.3 Humane embryonale Nierenepithelzelllinie HEK293

Die HEK293-Zellen wurden bei der DSMZ erworben und sind eine permanente Linie primärer humaner embryonaler Nierenzellen (HEK; Nummer: ACC 305; Kennzeichnung: 293). Die Zellen wurden durch Transfektion mit Adenovirus Typ 5 DNA immortalisiert.

6.2.1.4 Zellmedien und Zusätze

Tabelle 2: Medien und Zusätze für NHBE

NHBE	Zusammensetzung	Hersteller
Kulturmedium		
Bronchialepithelzell-Basalmedium (BEBM)	500 ml	Lonza Group Ltd.
Zusätze für Bronchialepithelzell-Wachstumsmedium (BEGM)	Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), 0,5 ml Insulin, 0,5 ml Transferrin, 0,5 ml Epinephrin, 0,5 ml Tri-Jodthyronin, 0,5 ml All-trans Retinolsäure, 0,5 ml Hydrokortison, 0,5 ml Rinderhypophysenextrakt (BPE), 2 ml Optional Amphotericin B + Gentamicin Sulfat, 0,5 ml	Lonza Group Ltd.

Tabelle 3: Medien und Zusätze für A549 und HEK293

A549/ HEK293	Zusammensetzung	Hersteller
Stimulationsmedium		
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	500 ml + 4500 mg/ml D-Glucose und Glutamax	Invitrogen™ Life Technologies Corporation
Wachstumsmedium		
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	500 ml + 4500 mg/ml D-Glucose und Glutamax	Invitrogen™ Life Technologies Corporation
Fetales Rinderserum (FBS)*	10%	Biochrom AG
Optional Penicillin- Streptomycin 100fach Konzentrat	1%	Invitrogen™ Life Technologies Corporation
Medium für Kryokonservierung		
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	70%	Invitrogen™ Life Technologies Corporation
FBS	20%	Biochrom AG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10%	Sigma Aldrich GmbH

*Das FBS wurde vor Gebrauch für 30min bei 56°C hitzeinaktiviert.

Tabelle 4: Sonstige Lösungen und Substanzen für die Zellkultur

Substanz	Verwendungszweck	Hersteller
Trypsin/ EDTA	Ablösen adhärenter Zellen	Lonza Group Ltd.
Trypsin-Neutralisationslösung (TNS)	Inhibition der Trypsin/ EDTA Lösung	Lonza Group Ltd.
Phosphatgepufferte Lösung nach Dulbecco (DPBS)	Spüllösung	Invitrogen™ Life Technologies Corporation
HEPES gepufferte Lösung (HBSM)	Spüllösung	Lonza Group Ltd.
Blasticidin S	Selektionsantibiotikum zur Selektion von stabil transfizierten A549-Zellen (30 µg/ml)	InvivoGen
Trypanblau	Lebendzellzahlbestimmung	Invitrogen™ Life Technologies Corporation

6.2.1.5 Stimulanzen und Inhibitoren

Tabelle 5: Stimulanzen

Stimulanzen	Ziel-Rezeptor	eingesetzte Konzentration	Hersteller
Pam ₃ Cys	TLR1/2	1 µg/ml	Enzo Life Science GmbH
Malp-2	TLR2/6	100 ng/ml	Enzo Life Science GmbH
Zymosan	TLR2/6 + Dectin-1	100 µg/ml	InvivoGen
PolyI:C (high molecular weight)	TLR3	100 ng/ml	InvivoGen
Flagellin	TLR5	100 ng/ml	InvivoGen
Rekombinantes humanes Interferon α 1a (IFNα)	IFN-Rezeptor	100 ng/ml	ImmunoTools GmbH
Rekombinanteshumanes Interferon β 1a (IFNβ)	IFN-Rezeptor	100 ng/ml	ImmunoTools GmbH
Rekombinanteshumanes Interferon γ (IFNγ)	IFN-Rezeptor	100 ng/ml	PromoCell GmbH
Rekombinanter humaner Tumornekrosefaktor α (TNFα)	TNF-Rezeptor	100 ng/ml	R&D Systems, Inc.

Tabelle 6: Inhibitoren

Inhibitor	Ziel-Struktur	eingesetzte Konzentration	Hersteller
Laminarin	Dectin-1	100 µg/ml	Sigma-Aldrich GmbH
Maus-anti-humanes Dectin-1 Antikörper, Klon MAB1859	Humanes Dectin-1	20 µg/ml	R&D Systems, Inc.
PP2 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(<i>t</i> -butyl)pyrazolo[3,4- <i>d</i>]pyrimidine	Src-Kinasen und Syk-Kinase	5 und 20 µM	Calbiochem® Merck Millipore
Raf1 Kinase Inhibitor I 5-Iodo-3-[(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)methylene]-2-indolinone	Raf1-Kinase	1 µM	Calbiochem® Merck Millipore

6.2.1.6 Verbrauchsmaterial für die Zellkultur**Tabelle 7: Zellkulturgefäße**

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
BD BioCoat™ 75cm ² Zellkulturflaschen	Subkultivierung von NHBE	BD Biosciences
BD BioCoat™ 25cm ² Zellkulturflaschen	Subkultivierung von NHBE	BD Biosciences
BD BioCoat™ 48well-Platten	Subkultivierung von NHBE	BD Biosciences
BD BioCoat™ 6well-Platten	Subkultivierung von NHBE	BD Biosciences
BD Falcon™ 75cm ² Zellkulturflaschen	Subkultivierung A549 und HEK293	BD Biosciences
BD Falcon™ 25cm ² Zellkulturflaschen	Subkultivierung A549 und HEK293	BD Biosciences
Costar® 48well-Platten	Subkultivierung A549 und HEK293	Corning, Inc.
Costar® 6well-Platten	Subkultivierung A549 und HEK293	Corning, Inc.
10cm Zellkulturschalen	Subkultivierung A549	Corning, Inc.

6.2.2 Bakterienkultur

6.2.2.1 Nontypeable *Haemophilus influenzae* Stämme

Nontypeable *H. influenzae* (NTHi) Stamm 2019 (ein klinisches Isolat aus einem Patienten mit COPD, (Campagnari et al. 1987)) und Stamm 86-028NP (ein klinisches Isolat aus einem Patienten mit Otitis media, (Harrison et al. 2005)) wurden freundlicherweise von Edward Swords (Department of Microbiology, University of Iowa, USA) zur Verfügung gestellt.

6.2.2.2 *Escherichia coli*-Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme dienten ausschließlich der Vermehrung und Isolation von Plasmid-DNA.

Tabelle 8: *E. coli*-Plasmidstocks

<i>E. coli</i> -Stamm	Bezeichnung Plasmid	Codiertes Protein	Antibiotika-resistenz	Bezogen von
GT116	pUNO1 mcs	-	Blasticidin	InvivoGen
GT116	pUNO1-hDectin1A	Humanes Dectin-1-Isoform A	Blasticidin	InvivoGen
DH5α	pUNO1-hDectin1a_Y3:15F	Humanes Dectin-1A-Mutante: Y3F+Y15F	Blasticidin	Entelechon GmbH
GT116	pUNO-hDectin1B	Humanes Dectin-1-Isoform B	Blasticidin	InvivoGen
GT116	pUNO1-hSyk	Humanes Syk	Blasticidin	InvivoGen
DH5α	pcDNA3 mycCard9	Humanes Card9	Ampicillin	Addgene
DH5α	pMSCV-FlagBcl10	Humanes Bcl10	Ampicillin	Addgene
GT116	pUNO1-hTLR2	Humanes TLR2	Blasticidin	InvivoGen
DH5α	pGL4.32[lucZP/NF-κB-RE/Hygro] (NFκB-Reporterplasmid)	NFκB-gekoppelte Luciferase	Ampicillin Hygromycin	Promega Corporation
DH5α	pGL4.74[hRluc/TK] (Renilla-Luciferase-Reporterplasmid)	Renilla-Luciferase	Ampicillin	Promega Corporation

6.2.2.3 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

Bakterienmedien, die selber angesetzt wurden, wurden im Autoklav für 20min bei 221 °C sterilisiert. Gegebenenfalls wurde nach Abkühlung des Mediums das Selektionsantibiotikum zugesetzt.

Tabelle 9: Medien und Zusätze für die Kultivierung von NTHi

NTHi	Zusammensetzung	Hersteller
Agar		
Schokoladenagar mit IsoVitaleX	Pankreatisch abgebautes Casein, 7,5 g/l Fleischpepton, 7,5 g/l Maisstärke, 1,0 g/l Dikaliumphosphat, 4,0 g/l Kaliumhydrogenphosphat, 1,0 g/l Natriumchlorid, 5,0 g/l Agar, 12 g/l Hämoglobin, 10,0 g/l (Hämin-Quelle) IsoVitaleX-Anreicherung, 12,0 ml (NAD-Quelle) Pyridoxal, 0,01 g/l Wachstumsfaktoren, 0,5 pH 7,2 ± 0,2	BD Biosciences
Flüssigmedium: sBHI (supplemented Brain Heart Infusion)		
Hirn-Herz-Aufguss (BHI, Brain Heart Infusion)	Kalbshirn, Aufguss von 200g, 7,7 g/l Rinderherz, Aufguss von 250g, 9,8 g/l ProteosePepton, 10,0 g/l Dextrose, 2,0 g/l Natriumchlorid, 5,0 g/l Natriumdiphosphat, 2,5 g/l	BD Biosciences
Hämin	10 µg/ml	Sigma-Aldrich GmbH
β-Nicotinamidadenindinukleotid (NAD)	10 µg/ml	MP Biomedicals
Kryomedium für NTHi		
sBHI	40%	
Glycerol	60%	Sigma-Aldrich GmbH

Tabelle 10: Medien und Zusätze für die Kultivierung von *E. coli*-Plasmidstocks

<i>E. coli</i> - Plasmidstocks	Zusammensetzung	Hersteller
Luria Bertani (LB) Medium		
Trypton	10 g/l	BD Biosciences
Hefeextrakt	5 g/l	Merck KGaA
Natriumchlorid	5 g/l	Carl Roth GmbH
Luria Bertani (LB) Medium		
Trypton	10 g/l	BD Biosciences
Hefeextrakt	5 g/l	Merck KGaA
Natriumchlorid	5 g/l	Carl Roth GmbH
Agar	15 g/l	Sigma-Aldrich GmbH
Fast-Media®BLAS-TB	TerrificBroth (TB)-basiertes Flüssigmedium, das 100 µg/ml Blasticidin S enthält	InvivoGen
Fast-Media®BLAS-Agar	LysogenyBroth basiertes festes Medium, das 100 µg/ml Blasticidin enthält	InvivoGen
Selektionsantibiotika		
Ampicillin	Arbeitskonzentration 100 µg/ml	Carl Roth GmbH

6.2.2.4 Verbrauchsmaterial für die Bakterienkultur

Tabelle 11: Verbrauchsmaterial für die Bakterienkultur

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Sterile Wattestäbchen	Überführen von Bakterien	NOBA Verbandmittel Danz GmbH Co KG
Einmal-Impfösen 10 µl, steril	Ausplattieren von Bakterien	VWR International GmbH
Petrischalenspatel Delta, steril	Ausplattieren von Bakterien	Carl Roth GmbH
10 cm Petrischalen	Gießen der Selektionsagarplatten	BD Falcon

6.2.3 Materialien für molekularbiologische Methoden

6.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Tabelle 12: Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Annealing Temperatur	Produktlänge
Dectin-1- <i>Splicing</i> Varianten	Vorwärts: TTCAGGGGCTCTCAAGAACA Rückwärts: TGAGGGCACACTACACAGTT	60 °C	Isoform A: 731 bp Isoform B: 593 bp Isoform C: 552 bp Isoform D: 474 bp Isoform E: 494 bp
Dectin-1A	Vorwärts: GTCCTGGGTACCATGGCTATT Rückwärts: GACACTTGTTTTACTATAAAATCCCAATTCA	61 °C	329 bp
Dectin-1B	Vorwärts: CCTGGGTACCATGGGGGTT Rückwärts: GACACTTGTTTTACTATAAAATCCCAATTCA	60 °C	189 bp
PPIB	Vorwärts: ATGTAGGCCGGGTGATCTTT Rückwärts: TGAAGTTCTCATCGGGGAAG	60 °C	219 bp
HPRT	Vorwärts: GACCAGTCAACAGGGGACAT Rückwärts: AACACTTCGTGGGGTCTCTTTTC	60 °C	195 bp
IL-8	Vorwärts: TCCAAACCTTTCCACCCCAA Rückwärts: ACTTCTCCACAACCCTCTGC	60 °C	154 bp
TLR2	Vorwärts: TGCATTCCCAAGACACTGGA Rückwärts: AGGGAGGCATCTGGTAGAGT	60 °C	131 bp
TLR6	Vorwärts: GCCCTGGTATCTCAGGATGG Rückwärts: TCACTTTTCACCCAGGCAGA	60 °C	144 bp
TLR1	Vorwärts: CAGGCCCTCTTCCTCGTTAG Rückwärts: TGGCAAAATGGAAGATGCTAGT	60 °C	157 bp
Card9	Vorwärts: CCCGCGTCTTCTCCATGAT Rückwärts: CGTCCTCGGCCTTCATGA	61 °C	369 bp
Bcl10	Vorwärts: AGCCTCTACGAGAGGGAAGG Rückwärts: AGGCGTCCTTCTTCACTTCA	60 °C	329 bp
Malt1	Vorwärts: GCCTCAGTTGCCTAGACCTG Rückwärts: TTCAGAGACGCCATCAACAC	60 °C	470 bp
Raf-1	Vorwärts: TCTACACCTCACGCCTTCAC Rückwärts: GAAGGTGAGGCTGATTCGCT	60 °C	176 bp
Syk	Vorwärts: GGGAGGAAGGCACACCACTA Rückwärts: CAGGCACAGGGCGTAGGA	60 °C	450 bp

IL-8 Promotor	Vorwärts: AAGAAACTTTCGTCATACTCCG Rückwärts: TGGCTTTTATATCATCACCTAC	60°C	170 bp
Galectin-3	Vorwärts: TGATGCGTTATCTGGGTCTG Rückwärts: GGCTGTCCAGAAGATGGGTA	60 °C	261 bp

Tabelle 13: Materialien für RNA-Isolation und Reverse-Transkription

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
RNeasy mini kit	RNA-Isolation	Qiagen
DNaseI	Abbau von genomischer DNA	Qiagen
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	RT-PCR	Applied Biosystems® Life Technologies
10x Puffer	2 µl/Reaktion	
25x NTP-Lösung	0,8 µl/Reaktion	
Random Primer	2 µl/Reaktion	
RNase-Inhibitor	1 µl/Reaktion	
Multiscribe Reverse Transcriptase	1 µl/Reaktion	
RNase- und DNase-freies A. dest.	Ad 20 µl	Ambion GmbH, life technologies
TE-Puffer, DNase/RNase-frei (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,4)	50% in A. dest., für Verdünnung der cDNA	Sigma Aldrich GmbH

Tabelle 14: Materialien für qPCR, semiquantitative PCR und Agarosegelelektrophorese

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
qPCR		
2x SensiMix SYBR Master Mix	10 µl/Ansatz	Bioline GmbH
PCR-Ansatz		
PerfectTaq Plus DNA Polymerase	0,25 µl/Reaktionsansatz (1U)	5-Prime GmbH
Perfect-LoadDye Konzentrat (10x)	2,5 µl/Reaktionsansatz	5-Prime GmbH
PerfectTaq Plus PCR Puffer (10x)	2,5 µl/Reaktionsansatz	5-Prime GmbH
dTTP (10 mM)	0,125 µl/Reaktionsansatz	Promega Corporation

dGTP (10 mM)	0,125 µl/Reaktionsansatz	Promega Corporation
dCTP (10 mM)	0,125 µl/Reaktionsansatz	Promega Corporation
dATP (10 mM)	0,125 µl/Reaktionsansatz	Promega Corporation
Vorwärts-Primer (10 µM)	0,5 µl/Reaktionsansatz	Eurofins MWG
Rückwärts-Primer (10 µM)	0,5 µl/Reaktionsansatz	Eurofins MWG
5x TBE (Laufpuffer)		
TRIS, pH 8,0	89 mM	Carl Roth GmbH
Borsäure	89 mM	Carl Roth GmbH
EDTA	2 mM	Sigma Aldrich GmbH
A. dest.		
Agarosegel		
Agarose	1,7 % in TBE (1,7g/100 ml)	Sigma Aldrich GmbH
Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml)	25 µg/100 ml	Sigma Aldrich GmbH
Längenstandard	O'GeneRuler 100bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Inc.
QIAquick Gel Extraction Kit	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	Qiagen
PCR Purification Kit	Reinigung von DNA (ChIP)	Qiagen

6.2.3.2 Transfektion

Tabelle 15: Materialien für die Transfektion von Zellen

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
PureYield Plasmid Midiprep System	Reinigung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	Promega Corporation
GeneCellin Transfektion Reagent	Transfektion eukaryontischer Zelllinien	BioCellChallenge

Tabelle 16: Plasmide

Bezeichnung	Codiertes Protein	Antibiotikaresistenz	Bezogen von
pUNO1 mcs	-	Blasticidin	InvivoGen
pUNO1-hDectin1A	Humanes Dectin-1-Isoform A	Blasticidin	InvivoGen
pUNO1-hDectin1a_Y3:15F	Humanes Dectin-1A-Mutante: Y3F+Y15F	Blasticidin	Entelechon GmbH
pUNO-hDectin1B	Humanes Dectin-1-Isoform B	Blasticidin	InvivoGen
pUNO1-hSyk	Humanes Syk	Blasticidin	InvivoGen
pcDNA3 mycCard9	Humanes Card9	Ampicillin	Addgene
pMSCV-FlagBcl10	Humanes Bcl10	Ampicillin	Addgene
pUNO1-hTLR2	Humanes TLR2	Blasticidin	InvivoGen
pGL4.32[lucZP/NF-κB-RE/Hygro] (NF-κB-Reporterplasmid)	NFκB-gekoppelte Luciferase	Ampicillin Hygromycin	Promega Corporation
pGL4.74[hRluc/TK] (Renilla-Luciferase-Reporterplasmid)	Renilla-Luciferase	Ampicillin	Promega Corporation

6.2.4 Antikörper

Tabelle 17: Primäre Antikörper

Antikörper	Verwendung	Hersteller
Maus-anti-humanes Dectin-1, Klon MAB1859 (IgG2B)	Inhibition, 20 µg/ml Immunhistochemie, 25 µg/ml	R&D Systems
Maus-anti-humanes Dectin-1, Klon GE2 (IgG1)	Durchflusszytometrie, 10 µg/ml	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gordon D. Brown (Section of Immunology and Infection, Division of Applied Medicine, Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, UK) (Willment et al. 2005)

NF-κBp65 (C-20)	Chromatin-Immunpräzipitation, 2µg/Probe	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Kaninchen-anti-polymerase II (N-20)	Chromatin-Immunpräzipitation, , 2 µg/Probe	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Kaninchen-anti humanes Galectin-3 (H-160), polyclonal	Western Blot, 0,1 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Tabelle 18: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verwendung	Hersteller
Ziege-anti-Maus, PE-gelabelt	Durchflusszyometrie, 5 µg/ml	Antikörper-online
Maus-IgG, Klon Be9.2	Isotyp-Kontrolle Immunhistochemie, 25 µg/ml	Freundlicherweise von W. Reutter, Charité-Universitätsmedizin Berlin, zur Verfügung gestellt
Ziege-anti-Kaninchen-HRP	Western Blot, 0,1 µg/ml	Dianova GmbH

6.2.5 Sonstige Puffer, Lösungen und Kits

Tabelle 19: ELISA

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Human IL-8 ELISA Set		BD Biosciences
Human IL-6 ELISA Ready-Set-Go		eBioscience, Inc.
0,1 M Carbonatpuffer pH 9,5 (Beschichtungslösung)		
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	4,2 g	Sigma Aldrich GmbH
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	1,78 g	Sigma Aldrich GmbH
A.dest	ad 500 ml,	
Waschpuffer		
Dulbecco's-PBS	99,95 %	
TWEEN20	0,05 %	Sigma Aldrich GmbH
Blockpuffer		
Dulbecco's-PBS	90%	

FBS	10%	Biochrom AG
TMB ELISA Substrate Solution		eBioscience, Inc.
Stopplösung (2N Schwefelsäure)		
A.dest.	445 ml	
96% Schwefelsäure	55 ml	Carl Roth GmbH

Tabelle 20: Puffer für Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Fixierlösung		
Dulbecco's-PBS	10 ml	PAA
Formaldehyd (35%)	1% (270 µl 35% Formaldehyd + 10 ml PBS)	Carl Roth GmbH
Neutralisationslösung		
Dulbecco's-PBS	500 ml	PAA
Glycin	0,125 M	Sigma Aldrich GmbH
ChIP-RIPA Lysepuffer, pH 7,6		
Tris	10 mM	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid	150 mM	Carl Roth GmbH
Tergitol® solution (NP-40)	1%	Sigma Aldrich GmbH
Natrium-Desoxycholat	1%	Sigma Aldrich GmbH
SDS	1%	Sigma Aldrich GmbH
A. dest.		
Hochsalzpuffer		
Natriumchlorid	2 M	Carl Roth GmbH
Tris, pH 7,5	10 mM	Carl Roth GmbH
Tergitol® solution (NP-40)	1%	Sigma Aldrich GmbH
Natrium-Desoxycholat	0,5%	Sigma Aldrich GmbH
EDTA	1 mM	Sigma Aldrich GmbH
A. dest.		

TE-Puffer		
Tris, pH 7,5	10 mM	Carl Roth GmbH
EDTA	1 mM	Sigma Aldrich GmbH
A. dest.		
Eluierungspuffer		
TE-Puffer	99%	
SDS	1%	Sigma Aldrich GmbH
Protein A und G Sepharose	40 µl/ Probe	GE Healthcare
Proteinase K 600 mAnson Unit/ml	5µl/Probe	Novagen® Merck KGaA
Ribonuklease A	1µl/Probe	Sigma Aldrich GmbH

Tabelle 21: Kits für Luciferase-Reporter-Assay

Antikörper	Verwendung	Hersteller
Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity	Luciferase-Reporter-Assay: Messung der NF-κB-Aktivierung	Roche Applied Science
Renilla Luciferase Assay System	Luciferase-Reporter-Assay: Messung der Aktivität der <i>Renilla</i> -Luciferase	Promega Corporation

Tabelle 22: Puffer und Substanzen für Western Blot

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
HBSM (HEPES buffered saline + magnesium)		
Natriumchlorid	150 mM	Carl Roth GmbH
Magnesiumchlorid	5 mM	Carl Roth GmbH
HEPES, pH 7,2	20 mM	Sigma Aldrich GmbH
A. dest.		
Lysepuffer		
TritonX-100	1%	Sigma Aldrich GmbH
SDS	0,2%	Sigma Aldrich GmbH
Proteinase-Inhibitor-Cocktail	1:100	Merck KGaA

PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	1 mM	Sigma Aldrich GmbH
HBSM		
Benzonase Nuklease	0,5 µl/Probe	Sigma Aldrich GmbH
PageRuler Plus Protein Ladder	2µl/Tasche	Thermo Fisher Scientific, Inc
NuPAGE® LDS Sample Buffer 4x	1 Teil NuPAGE + 3 Teile Probe	Life Technologies GmbH
10x Laufpuffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese		
Tris, pH8,8	0,25 M	Carl Roth GmbH
Glycin	1,92 M	Sigma Aldrich GmbH
SDS	1%	Sigma Aldrich GmbH
A. dest.		
10x Transferpuffer		
Glycin	1,5 M	Sigma Aldrich GmbH
Tris, pH 8,3	0,2 M	Carl Roth GmbH
A. dest.		
1x Transferpuffer für Immunoblot		
10x Transferpuffer	100 ml	
A. dest.	700 ml	
Ethanol, vergällt	200 ml	Carl Roth GmbH
Ponceau-S-Lösung		Sigma Aldrich GmbH
10x TBS Waschpuffer		
Natriumchlorid	1,5 M	Carl Roth GmbH
Tris, pH 7,6	0,1 M	Carl Roth GmbH
A. dest.		
TBS-T Waschpuffer		
1x TBS	1 l	
Tween20	0,1%	Sigma Aldrich GmbH
Blockierlösung		
Milchpulver, Blotting grade	5%	Carl Roth GmbH

1x TBS	Ad 10 ml	
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate		Thermo Fisher Scientific

Tabelle 23: Sonstige Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS), pH 7,4		
Natriumchlorid	140 mM	Carl Roth GmbH
Di-Natrium-Hydrogenphosphat	10 mM	
Kaliumchlorid	2,7 mM	
Kalium-Di-Hydrogenphosphat	1,8 mM	
A.dest.		
2% Paraformaldehyd		
Paraformaldehyd	2g/100ml	Carl Roth GmbH
PBS	100 ml	

6.2.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Allgemein verwendete Materialien wie Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße u.ä. entsprechen den gängigen Standards und werden hier nicht extra aufgelistet.

Tabelle 24: Sonstige Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Zellheber	Abschaben von adhärenen Zellen	VWR International
NuncImmunoMaxisorp 96well Flachbodenplatte	ELISA	VWR International
Verschlussfolien für Mikrotiterplatten	ELISA	VWR International
LuniNunc™ F96 MicroWell™ Platten, weiß	Luciferase-Reporter-Assay	VWR International
Mini-Protean TGX Gels 4-15%, 15well	Polyacrylamidgel für SDS-Gelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories, Inc.

Transfermembran Nitrozellulose	Western Blot	Thermo Fisher Scientific
--------------------------------	--------------	--------------------------

6.2.7 Geräte

Tabelle 25: Geräte

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Zellkultur		
Sicherheitswerkbank Maxisafe 2020	Sterile Arbeiten	Thermo Fisher Scientific, Inc.
CO ₂ -Inkubator Galaxy 170S	Inkubation der Zellen	NewBrunswick – Eppendorf AG
Wasserbad TW20	Erwärmung von Medien und Lösungen	Julabo GmbH
Countess™ automated cell counter	Zellzahlbestimmung	Invitrogen™ Life technologies Corporation
Stereomikroskop primovort	Mikroskopie	Carl Zeiss MicroImaging GmbH
Zentrifuge 5810 R	Zentrifugation	Eppendorf AG
Absauggerät VACUSAVE	Absaugen von Überständen	Integra Biosciences
Durchflusszytometrie		
FACS Aria II	Durchflusszytometrie und Sortieren von Zellen	BD Biosciences
FACS Calibur	Durchflusszytometrie	BD Biosciences
Bakterienkultur		
CO ₂ -Inkubator HERA cell 150	Inkubation von Agarplatten und infizierten Zellen	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Inkubationsschüttler I26	Inkubation von Bakterien-Flüssigkulturen	NewBrunswick – Eppendorf AG
Sicherheitswerkbank HERA safe	Sterile Arbeiten	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Biophotometer 6132 plus	OD-Messung von Bakterien-Suspensionen	Eppendorf AG
Koloniezählgerät ProtoCOL2	Automatisiertes Zählen von Kolonien auf Agarplatten	Symbiosis
Haereus Multifuge X3R	Zentrifugation	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Labormikroskop	Mikroskopie	Leica Microsystems

Molekularbiologische Methoden		
S1000TM Thermal Cycler	RT/ semiquantitative PCR	BioRad Laboratories, Inc.
Corbett Rotor-Gene 6000	qPCR	Corbett Life Science
Roboter CAS-1200	Pipettierrobotor für PCR-Ansätze	Corbett Life Science
NanoDrop D-1000 Spectrophotometer	Konzentrationsbestimmung von RNS und DNS	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Sonopuls HD 3100	Sonifizierung ChIP	Bandelin electronic GmbH & Co KG
Sonstige		
Infinite® M200	Plattenlesegerät für Adsorptions- und Lumineszenzmessungen	Tecan Group Ltd.
Fusion Fx7	Chemilumineszenzmessung, Western Blot und Fluoreszenzmessung in Agarosegelen	PeQlab Biotechnologie GmbH
Powerpac™ HC Power Supply	Stromversorgung in Acrylamidgel- und Agarosegelelektrophorese	BioRad Laboratories, Inc.
Thermomixer COMPACT_5350	Aufkochen der Proben für Acrylamidgelelektrophorese	Eppendorf AG
Polymax 2040	Taumelnder Plattformschüttler	Heidolf Instruments GmbH & Co.KG
Präzisionswaage EWB 620-2M	Abwiegen von Substanzen	Sartorius
VortexGenie 2	Homogenisieren von Lösungen	Scientific Industries, Inc.
Zentrifuge 5804 R	Zentrifugation	Eppendorf AG
Zentrifuge 5418 R	Zentrifugation	Eppendorf AG

6.3 Methoden

6.3.1 Zellkultur

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten und steril filtrierten Lösungen.

Die Zellen wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

Alle Medien und Lösungen wurden vor Verwendung auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt.

6.3.1.1 Kultivierung und Subkultivierung von primären humanen Bronchialepithelzellen (NHBE)

Die NHBE-Zellen wurden mit BEGM Wachstumsmedium in mit CollagenI-beschichteten Kulturgefäßen kultiviert. Sie wurden von Passage 2 bis 7 verwendet. Da die Zellen kontaktinhibiert werden, dürfen sie für die Subkultivierung eine Dichte von 80% Konfluenz nicht überschreiten.

Zum Splitten der Zellen wurden diese zunächst vorsichtig mit HBSS (ca. 5 ml pro 75cm²-Flasche) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA (2,5 ml/75cm²-Flasche) und anschließende Inkubation für ca. 2-3 min im Brutschrank vom Flaschenboden abgelöst. Durch Zugabe von 5 ml TNS wurde die enzymatische Reaktion des Trypsins abgestoppt. Die Zellsuspension wurde nun in ein 50ml-Zentrifugationsröhrchen überführt, der Flaschenboden nochmals mit HBSS (2,5 ml/75cm²-Flasche) gespült und die Spüllösung ebenfalls in das 50ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 200 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in einem kleinen Volumen (2-3 ml/75cm²-Flasche) re-suspendiert. Nachdem die Zellen gezählt wurden, wurden sie mit einer Mindestdichte von 3500 Zellen/ cm² in neue Zellkulturflaschen oder -platten ausgesät. Nach 2 Tagen wurde das Medium erstmals gewechselt (15 ml/75cm²-Flasche),

danach erfolgte der Mediumwechsel täglich, bis die Zellen erneut gesplittet oder für Experimente verwendet wurden.

6.3.1.2 Kultivierung und Subkultivierung der alveolären Zelllinie A549

Die A549-Zellen wurden alle 3-4 Tage bei ca. 95% Konfluenz subkultiviert. Dafür wurden die Zellen zunächst mit PBS vorsichtig gewaschen (5 ml/75cm²-Flasche) und anschließend mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung (2 ml/75cm²-Lösung) bei 37°C inkubiert bis sich die Zellen ablösen (ca. 2-3 min). Nach Zugabe von 8 ml Wachstumsmedium wurden die Zellen nun in ein 50ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in frischem Wachstumsmedium re-suspendiert und die Zelldichte bestimmt. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von ca. 2×10^5 Zellen/ml in neue Zellkulturgefäße ausgesät.

6.3.1.3 Stabile Transfektion von A549-Zellen

Für die Überexpression von Dectin-1 in A549-Zellen wurden die Zellen stabil mit den Plasmiden pUNO1mcs (Vektorkontrolle), pUNO1-hDectin1A (Wildtyp Dectin-1A), pUNO1-hDectin1a_Y3:15F (Phosphorylierungsmutante von Dectin-1A) oder pUNO-hDectin1b (Wildtyp Dectin-1 B) transfiziert. Dafür wurden 6×10^5 Zellen am Vortag in eine 6cm-Schale ausgesät, so dass die Zellen am Tag der Transfektion eine Dichte von ca. 60% Konfluenz erreicht hatten. Die Transfektion erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers mit 12 µl „GeneCellin Transfektionsreagenz“ (von BioCellChallenge) und 6 µg DNA. Nach 48 h wurden die erfolgreich transfizierten Zellen durch Zugabe von 30 µg/ml Blasticidin selektioniert. Nach ca. 2 Wochen wurden die Zellen schließlich lebend mit einem spezifischen Antikörper gegen humanes Dectin-1 (GE2) gefärbt und die positiv gefärbte Zellpopulation mit Hilfe des BD FACSAria II sortiert. Für die Subkultivierung der stabil transfizierten Zellen wurde dem Wachstumsmedium stets 30 µg/ml Blasticidin zugesetzt.

6.3.1.4 Transiente Transfektion von A549-Zellen

Für die transiente Transfektion von A549-Zellen mit Syk und/oder Card9 und Bcl10 wurden die stabil transfizierten Zelllinien A549-Dectin-1A und A549-Dectin-1B in einer Dichte von 10^5 Zellen/ml (250 μ l/well) in eine 48-well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen bei einer Konfluenz von ca. 60%. Dazu wurden eine Gesamtmenge von 1 μ l/well „GeneCellin Transfektionsreagenz“ (von BioCellChallenge) und 90 μ g DNA (30 μ g/Plasmid) pro Vertiefung verwendet. In Ansätzen mit weniger als drei verschiedenen Plasmiden wurde eine entsprechende Menge Leervektor (pUNO1 mcs) zugegeben, um in allen Ansätzen die gleiche Gesamtmenge zu verwenden. 22 h nach der Transfektion wurde das Medium gegen Stimulationsmedium ohne FBS ausgetauscht und nach nochmals 2 h wurden die Zellen mit NTHi (MOI 100) stimuliert. Nach 18h wurden die Überstände abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

6.3.1.5 Kultivierung und Subkultivierung der Zelllinie HEK293

Die Subkultivierung der HEK293-Zellen erfolgte analog zu der Subkultivierung der A549-Zellen.

6.3.1.6 Kryokonservierung von Zelllinien

Für die Kryokonservierung von A549 oder HEK293 wurden Zellen aus ca. 95% konfluenten Kulturen zunächst analog zur Subkultivierung gewaschen, trypsiniert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in kaltem (4 °C) Kryokonservierungsmedium suspendiert und zu je 1ml mit ca. 3×10^6 Zellen auf Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden in einer Kryobox mit Isopropanolfüllung (Nalgene „MrFrosty“ freezing container, Thermo Fisher Scientific, Inc.) für 24 h bei -80 °C inkubiert. Die Isopropanolfüllung bewirkt ein langsames Herunterkühlen der Proben, was Schäden durch Kristallisationsprozesse minimiert. Anschließend wurden die Röhrchen in die Gasphase von Flüssigstickstoff (<-160 °C) gebracht.

6.3.1.7 Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff in einem Wasserbad bei 37 °C vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen re-suspendiert, in 10 ml

warmes Kulturmedium aufgenommen und 5 min bei 200 x g sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in 10ml Kulturmedium suspendiert und in 75cm²-Zellkulturflaschen ausgesät.

6.3.1.8 Bestimmung der Zellzahlen

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen, wie bei der Subkultivierung beschrieben, von der Kulturschale abgelöst, zentrifugiert und re-suspendiert. Danach wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblaulösung gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Anschließend wurde die Anzahl an Zellen über zwei Großquadraten ermittelt und der Mittelwert berechnet. Mit Hilfe der Zellzahl, dem Verdünnungsfaktor (aus der Mischung mit der Zellsuspension und der Trypanblaulösung ergibt sich ein Verdünnungsfaktor 2) und der Kammerkonstante (10^4) lässt sich die Konzentration an Zellen in der Zellsuspension wie folgt berechnen:

$$\text{Zellzahl/ ml} = (\text{Zellzahl aus 2 Großquadraten}) / 2 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante}$$

Alternativ zur dieser manuellen Zellzahlbestimmung wurde die Zellzahl automatisiert mit dem „CountessTM automated CellCounter“ von Invitrogen ermittelt.

6.3.1.9 Stimulation von Zellen

Für Stimulationsexperimente wurden die Zellen bis zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers kultiviert. Vor der Stimulation wurde das Wachstumsmedium gegen antibiotikafreies und bei A549- und HEK293-Zellen auch serumfreies Stimulationsmedium ausgetauscht. Dieser Mediumwechsel erfolgte in der Regel ca. 2 h vor der Stimulation. Eine Ausnahme bildete die Stimulation für ChIP-Experimente. Hier erfolgte der Mediumwechsel 18-20 h vor der Stimulation. Für Infektionsexperimente wurde des Weiteren die Zellzahl pro Ansatz ermittelt. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und, wie oben beschrieben, gezählt.

Bei der Verwendung von Inhibitoren wurden die Zellen vor der Stimulation 1h mit dem Inhibitor vorinkubiert. Zellen, die lediglich mit dem Inhibitor stimuliert wurden, dienten als Kontrollen. Als weitere Negativkontrolle wurde zu jedem Versuch das gleiche Volumen des entsprechenden Lösungsmittels eingesetzt.

6.3.2 Mikrobiologische Methoden

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Bakterienkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten.

6.3.2.1 Kultivierung und Aufbewahrung von nontypeable *Haemophilus influenzae*

Die Bakterien wurden aus einem Glycerolstock auf Schokoladenagar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Für Infektionsexperimente wurden am nächsten Tag einige Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen in sBHI überimpft (OD_{600nm} 0,03-0,06) und bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600nm} 0,3-0,4) bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 3500 x g für 5min pelletiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Dann wurden die Bakterien in PBS re-suspendiert und durch Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) die Konzentration bestimmt. Eine OD_{600nm} von 0,1 entsprach dabei einer Konzentration von 10⁸ Kolonie-bildenden Einheiten (cfu, *engl.* colony forming units). Stimuliert wurde in der Regel mit einer Infektionsdosis von 100 Bakterien pro Zelle (Multiplizität der Infektion (MOI) 100). Zur Kryokonservierung wurden sämtliche Bakterien einer Übernachtskultur oder einer Flüssigkultur in der exponentiellen Wachstumsphase in Kryomedium re-suspendiert und bei -80°C eingefroren.

6.3.2.2 Cfu-basierter Adhäsionsassay von NTHi an A549

Für die Durchführung eines cfu-basierten Adhäsionsassays von NTHi auf A549-Zellen wurden zunächst stabil mit Dectin-1 transformierte Zellen in 24well-Platten und Bakterien wie oben beschrieben für die Infektion vorbereitet. 10⁸ cfu der Bakterien wurden vor der Infektion in einem Gesamtvolumen von 100 µl PBS mit oder ohne 30 µg/ml rekombinantem humanen Galectin-3 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde ein Teil der beiden Ansätze verdünnt und auf Schokoladenagar ausplattiert, um die Ausgangscfu zu bestimmen. Des Weiteren wurden aus beiden Ansätze Zellen von A549-Vektor, A549-Dectin-1A und A549-Dectin-1A_Y3:15F und A549-Dectin-1B jeweils in Triplikaten infiziert. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 1 h wurden die Zellen 5x mit PBS gewaschen und mit 250 µl Trypsin/EDTA abgelöst. Das Trypsin wurde nach 5 min bei 37 °C durch

Zugabe von 250 µl 20% FBS in PBS inhibiert, die Zellsuspension sorgfältig re-suspendiert und in 2ml-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Proben 1min gemixt, verdünnt und auf Schokoladenagar ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien auf allen Platten unter Verwendung des „ProtoCOL 2“ Koloniezählgerätes von Symbiosis automatisiert ausgezählt.

6.3.2.3 NTHi-rhGalectin-3-Pulldown

Mit Hilfe des „NTHi-rhGalectin-3-Pulldowns“ sollte eine Bindung zwischen Galectin-3 und NTHi nachgewiesen werden. Er wurde unter meiner Anleitung von der Studentin Julia Müller im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

NTHi wurde in sBHI bis zur exponentiellen Phase kultiviert, anschließend bei 3500xg 5 min zentrifugiert und die Bakterien in PBS suspendiert. Anschließend wurde mittels OD-Messung die Bakterienkonzentration bestimmt und jeweils 5×10^8 cfu in zwei 2ml-Zentrifugationsröhrchen gegeben. Zu einem Ansatz wurde 1 µg rekombinantes humanes Galectin-3 (rhGal3) zugegeben, zu dem anderen Ansatz das gleiche Volumen an PBS. Anschließend wurden beide Ansätze auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Beide Ansätze wurden nun für 1 h bei Raumtemperatur im Inkubationsschüttler inkubiert. Danach wurden die Bakterien bei 4000 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand, in dem nicht gebundenes rhGal3 verblieben war, nach Zugabe von 1 µl Proteinase-Inhibitor-Cocktail bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren. Das Bakterienpellet wurde in 500 µl PBS re-suspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 50 µl Lysepuffer lysiert. Das Lysat wurde 1 h auf Eis inkubiert, dann wurde die DNA durch Zugabe von 0,5 µl Benzonase Nuklease verdaut (5-15 min) und das Lysat bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Anschließend wurde mit Hilfe eines Western Blots nachgewiesen, ob das rhGal3 an die Bakterien gebunden hatte und daher im Bakterienlysate nachgewiesen werden konnte oder ob es im Überstand verblieben war.

6.3.2.4 Kultivierung, Aufbewahrung und Verwendung von *Escherichia coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme dienten ausschließlich der Vermehrung und Isolation von Plasmid-DNA.

Die Bakterien wurden aus einem Glycerolstock auf selektivem LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden diese Platten bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt und verwendet, um mehrere Einzelkolonien in 100ml selektives LB-Flüssigmedium zu überimpfen. Diese Kulturen wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert und am nächsten Tag für die Isolation von Plasmid-DNA und ggf. zum Ansetzen neuer Glycerolstocks verwendet. Für die Isolation von Plasmid-DNA wurde das „PureYield Plasmid Midiprep System“ von Promega entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

6.3.3 Molekularbiologische Methoden

6.3.3.1 Reinigung von RNA und Synthese von cDNA

Um die Menge an Boten-RNA (mRNA) eines bestimmten Gens zu quantifizieren, wurde zunächst mit Hilfe des „Qiagen RNeasy mini Kits“ die gesamte RNA aus ca. 2×10^6 Zellen isoliert. Dabei wurde genomische DNA mit DNaseI (Qiagen) auf der Säule abgebaut. Unter Verwendung des „NanoDrop D-1000 Spectrophotometers“ (Thermo Fisher Scientific, Inc.) wurde die Konzentration gereinigter RNA anhand der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt und die Reinheit mit Hilfe einer Kontrollmessung bei 280 nm und 230 nm überprüft. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C aufbewahrt. Anschließend wurde mittels Reverse-Transkription (RT) von 2 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert, wofür das „High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit“ (RT-Kit) von Applied Biosystems entsprechend der Herstellerangaben verwendet wurde. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit 5 µg RNA in A. dest., ohne RT-Kit mitgeführt (RT- Kontrolle), um die Kontamination der Probe mit genomischer DNA überprüfen zu können. Die Reaktion erfolgte nach einer 10-minütigen Inkubation bei 25 °C für 2 h bei 37 °C und wurde durch 5-minütiges Erhitzen bei 85°C beendet. Die cDNA wurde durch Zugabe von 130 µl 0,5x TE Puffer verdünnt und bei -20 °C aufbewahrt. Die Quantifizierung spezifischer cDNA erfolgte entweder mit Hilfe von quantitativer oder semiquantitativer PCR.

6.3.3.2 Semiquantitative PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *engl.* Polymerase Chain Reaction) kann eine definierte DNA-Sequenz *in vitro* amplifiziert werden. Die Reaktion basiert auf drei Teilschritten: der thermischen Denaturierung der DNA-Matrize, der Hybridisierung eines spezifischen Oligonukleotids (des Primers) mit der Matrize und der Synthese eines komplementären DNA-Stranges zwischen den Primern mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase (Elongation). Durch eine zyklische Wiederholung der Teilschritte wird die gewünschte Sequenz exponentiell vervielfältigt. Anschließend können die DNA-Fragmente aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren in einem Agarosegel elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, die dadurch aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

Bei der semiquantitativen PCR wurde die cDNA (5µl/Reaktionsansatz) unter Verwendung von „Taq DNA Polymerase“ von 5-Prime amplifiziert (25µl Gesamtvolumen/Reaktionsansatz). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 12 angegeben. Für jede Ziel-RNA wurde ein spezifischer Primer mit Hilfe des im Internet verfügbaren „primer-BLAST tool“ des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) designiert. Eventuelle Sekundärstrukturen des PCR-Produktes an den Bindungsstellen der Primer wurden durch Analyse der Nukleotidsequenz anhand des „Mfold Algorithmus“ (Zuker 2003) ausgeschlossen. Die PCR-Konditionen sind in Tabelle 26 angegeben. Die PCR-Produkte wurden in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 1,7%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem UV-Transiluminator („Fusion Fx7“, PeQlab Biotechnologie GmbH) sichtbar gemacht.

Tabelle 26: PCR-Konditionen

Schritt	Dauer	Temperatur
Aktivierung der TaqPolymerase	3 min	94 °C
Denaturierung	30 sek	94 °C
Hybridisierung	30 sek	Primer-abhängig
Elongation	30 sek	72 °C
Wiederholung des Zyklus ab Denaturierung; Anzahl der Zyklen abhängig von der Ziel cDNA		
Elongation	10 min	72 °C

6.3.3.3 Quantitative PCR (qPCR)

Die Real-Time qPCR bietet die Möglichkeit, die Menge einer bestimmten RNA in verschiedenen Proben relativ zueinander zu quantifizieren. Sie beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, wobei fluoreszierende Reporterfarbstoffe verwendet werden (hier SYBR Green I), die in doppelsträngige DNA interkalieren. Dadurch kommt es proportional zur Zunahme an PCR-Produkt zu einem Anstieg der Fluoreszenz der Probe, wodurch die Menge an amplifizierter DNA nach jedem Zyklus erfasst werden kann.

In dieser Arbeit wurde für die qPCR das Gerät „Corbett Rotor-Gene 6000“ verwendet. Die Ansätze wurden mit dem Roboter „CAS-1200“ pipettiert und jede Probe wurde in Triplikaten gemessen. Um die Effizienz des DNA-Verdaus während der RNA-Extraktion zu überprüfen, wurde die RT- Negativkontrolle verwendet. Die PCR erfolgte mit einem Reaktionsvolumen von insgesamt 20 µl (10 µl 2x SensiMix SYBR Master Mix, Bioline, 0,2 µM Primer und 4 µl cDNA). Die qPCR-Reaktion bestand aus einem initialen Schritt von 95°C für 10min, gefolgt von 40 Zyklen aus 15 s 95 °C, 20 s 60°C und 20 s 72 °C. Die Spezifität der Primerpaare wurde anhand semiquantitativer PCR und anschließender Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Die Effizienz der Primerpaare wurde anhand einer seriellen Verdünnung des Templates per qPCR verifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 12 angegeben.

Für die Analyse der relativen Expression der Ziel-Gene wurde die „Pfaffl Methode“ (Pfaffl 2001) angewendet. Dabei wurde das Expressionslevel auf den geometrischen Mittelwert der Expression von den beiden Haushaltsgenen (*engl.* Housekeeping genes) Hypoxanthine phosphoribosyltransferase1 (HPRT1) und Peptidylpropylisomerase B (PPIB) normalisiert. Haushaltsgene sind nicht-regulierte Gene, die konstitutiv exprimiert werden. Die Stabilität der Expression dieser Haushaltsgene wurde mit dem „BestKeeper Algorithmus“ (Pfaffl et al. 2004) kalkuliert. Relative Unterschiede zwischen der mRNA-Expression in verschiedenen experimentellen Konditionen wurden mit der Software „Rest“ berechnet (Pfaffl et al. 2002). Um die Signifikanz von Unterschieden zu analysieren, führt diese Software paarweise fixierte Randomisationstests durch.

6.3.3.4 Reinigung und Sequenzierung von PCR-Produkten

Um die unterschiedlichen *Splicing*-Varianten von Dectin-1 zu identifizieren, wurden die verschiedenen Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit dem

„QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen gereinigt. Anschließend wurde diese DNA mit demselben Primerpaar (Dectin-1-*Splicing*-Varianten) re-amplifiziert und die Reinheit des daraus erhaltenen Produkts anhand einer Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Die Sequenzierung wurde von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt und die Sequenzen mit den Sequenzen bekannter *Splicing*-Varianten (NCBI, Ensembl) mit Hilfe der Software „ClustalX“ verglichen.

6.3.4 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) dient dem Nachweis der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Promotoren bestimmter Gene (hier die Bindung der Untereinheit p65 des Transkriptionsfaktors NF- κ B an den Promotor des IL8-Gens). Dazu werden die Zellen zunächst fixiert, wobei Proteine und DNA reversibel quervernetzt werden. Dann werden die Zellen lysiert und die DNA mittels Ultraschall in Fragmente zerteilt. Als nächstes erfolgt eine Immunpräzipitation des Transkriptionsfaktors mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers. Nachdem die Proteine verdaut wurden, kann aus der DNA, die an den präzipitierten Transkriptionsfaktors gebunden hatte, die spezifische Zielsequenz in einer PCR amplifiziert werden.

Die ChIP wurde analog zu der Beschreibung in (Slevogt et al. 2008a) durchgeführt:

Die A549-Zellen wurden in 10cm-Schalen ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz am Vorabend der Stimulation in Medium ohne Antibiotika und FBS umgefüttert. Am nächsten Tag wurden sie für 1 h mit NTHi (MOI 100) stimuliert und anschließend in 4 ml warmem 1% Formaldehyd in PBS fixiert. Nach 1 min wurde die Fixierlösung abgesaugt und 4 ml eiskalte Neutralisationslösung (0,125 M Glycin in PBS) zugegeben. Die Neutralisationslösung wurde wiederum abgesaugt und 4 ml eiskaltes PBS zugegeben. Als nächstes wurden die Zellen vom Boden der Schale abgeschabt, suspendiert und in ein 15ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 200xg wurde das Zellpellet erneut mit 4 ml eiskaltem PBS gewaschen, zentrifugiert und in 1 ml „ChIP-Radioimmunpräzipitationsassay (RIPA)-Lysepuffer“ lysiert. Als nächstes wurde die DNA mit Hilfe von Ultraschall fragmentiert. Diese sogenannte Sonifizierung erfolgte mit der Sonde „MS73“ des Gerätes „Sonopuls HD3100“ von Bandelin electronic. Dabei wurden die Proben auf Eis in vier Zyklen aus 60 s bei 30% Leistung und 60 s Pause

sonifiziert. Danach wurden die Proben aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Für die Immunpräzipitation wurden je 250 µl Probe mit 2 µg des jeweiligen Antikörpers (NF-κBp65 und Polymerase II) über Nacht bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Immunkomplexe an Protein A/G Sepharose gebunden. Dazu wurden die Proben mit 100 µl des Sepharosegemisches aus 20µl Protein A Sepharose, 20µl ProteinG Sepharose und 60µl „ChIP-RIPA-Puffer“, für 1h im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Danach wurden die Sepharose-Beads mit den gebundenen Immunkomplexen für 1 min bei 14000x g zentrifugiert und dann zweimal mit kaltem „ChIP-Ripa-Puffer“, einmal mit kaltem High-Salt-Puffer, wieder einmal mit „ChIP-RIPA-Puffer“ und zuletzt mit TE-Puffer gewaschen. Schließlich wurden die Proteine durch Zugabe von 55 µl Eluierungspuffer und eine 15minütige Inkubation bei 30°C von den Sepharose Beads gelöst. Nach erneuter Zentrifugation wurden für den RNA-Verdau 50 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß mit 150 µl TE-Puffer mit 0,5% RNase A überführt. Parallel wurden für die Input-Kontrollen je 50 µl der sonifizierten Lysate mit 5µl einer 10% SDS-Lösung versetzt und ebenfalls zu 150 µl TE-Puffer mit 0,5% RNase A gegeben. Die Ansätze wurden nun für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Protein verdaut. Dazu wurde jede Probe mit 2,5% Proteinase K versetzt und 6h bei 37°C inkubiert. Zuletzt erfolgt die Reinigung der enthaltenen DNA mit Hilfe des „PCR Purification Kits“ von Qiagen und die Amplifikation des IL-8-Promotors in einer semiquantitativen PCR (siehe Kapitel 6.3.3.2.).

6.3.5 Gewinnung und immunhistochemische Färbung humaner Lungenschnitte

Die Lungensektionen wurden in Kooperation von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals (Klinik für Innere Medizin V – Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin, Universitätsklinikum des Saarlandes, Kirrbergerstraße 1, 66421 Homburg Saar), Prof. Dr. med. Hendrik Dienemann und Dr. med. Christiane Grünewald (Chirurgie der Thoraxklinik am Universitätsklinikum Heidelberg, Amalienstraße 5, 69126 Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Immunhistochemie wurde von PD. Dr. rer. nat. Bernhard B. Singer (Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen, Hufelandstraße 5, 45147 Essen) durchgeführt.

Die Entnahme von Lungengewebe von 19 verschiedenen Patienten wurde in der Chirurgie der Thoraxklinik am Universitätsklinikum Heidelberg (Amalienstraße 5, 69126 Heidelberg) ausgeführt. Das Lungengewebe stammt aus nicht-tumorösen Bereichen von chirurgischen Lungenresektionen, die durchgeführt wurden, um eine Erkrankung an Lungenkrebs zu behandeln. Die Zustimmung der Ethikkommission der Universität Heidelberg und Einverständniserklärungen der Patienten wurden eingeholt. Die Lungensektionen wurden nach Standardprozedur in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (Koczulla et al. 2003).

Für die immunhistochemische Färbung der Lungensektionen wurden diese zunächst deparaffinisiert (Histoclear 3 x 5 min, 100% Ethanol 5 min, 96% Ethanol 5 min, 80% Ethanol 5 min, 70% Ethanol 5 min) und rehydriert (H₂O 2 x 5 min). Dann wurden die Proben in 2% Kaninchenserum (in PBS) geblockt bevor sie über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (anti-Dectin-1, Klon MAB1859, oder Isotyp-Kontrolle) gefärbt wurden. Anschließend wurden die Sektionen für 1h bei Raumtemperatur mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Danach wurde die „Nickel-Glucose Oxydase Entwicklungstechnik“ angewendet, um das DAB Chromogen der Peroxydasereaktion zu verstärken. Schließlich wurden die Schnitte für 1-2 min mit „Calcium Rot“ gegengefärbt, um Gewebestrukturen sichtbar zu machen.

6.3.6 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann die Größe, Granularität und Fluoreszenz einzelner Zellen analysiert werden. Dabei werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt und hintereinander durch eine Messzelle, die sogenannte „*flow cell*“ geleitet, wo sie von einem Laser angestrahlt werden. Anhand des Streulichtes und des induzierten Fluoreszenzlichtes können Größe, Granularität und Fluoreszenz bestimmt werden. Die Fluoreszenz ist in der Regel auf mit Fluorochromen gekoppelte Antikörper zurückzuführen, die an spezifische Antigene auf der Zelloberfläche gebunden haben. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zu der Menge an gebundenem Antikörper und erlaubt dadurch die Quantifizierung einer spezifischen Struktur auf der Oberfläche der Zellen.

Um die Expression von Dectin-1 auf der Oberfläche von NHBE-Zellen nachzuweisen, wurden diese wie oben beschrieben bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden sie

mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst, in kaltem 2%igen Paraformaldehyd in PBS suspendiert und für 20 min auf Eis fixiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert, das Pellet in 10% FBS in PBS aufgenommen und für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C geblockt. 3×10^5 Zellen pro Ansatz wurden in einem Volumen von 50 µl mit dem primären anti-Dectin-1-Antikörper Klon GE2 (Verdünnung 1:100) für 45 min bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurden die Zellen 3x mit 10% FBS in PBS gewaschen, der Sekundärantikörper (anti-Maus, Verdünnung 1:100) zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen 2x mit 10% FBS in PBS und 1x mit PBS gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert.

Die Analyse der Dectin-1-Expression auf A549-Zellen wurde anhand von unfixierten Zellen unter sterilen Bedingungen auf Eis durchgeführt, da die Zellen anschließend sortiert und positive Zellen weiterkultiviert wurden.

Als Negativkontrollen wurden Zellen verwendet, die nur mit dem Sekundärantikörper oder mit einer Isotypkontrolle gefärbt wurden.

Für die Messungen wurden entweder das Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences) oder FACS Aria II (BD Biosciences; zum Sortieren) verwendet. Die Daten wurden mit der Software "FlowJo 7.6.4" analysiert.

6.3.7 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Der ELISA (*engl.* Enzyme-linked immunosorbent assay) ist ein immunologisches Testverfahren zur Quantifizierung spezifischer Antigene wie z.B. Zytokine aus Zellkulturüberständen. Dazu wird zunächst der Boden einer Testplatte mit einem spezifischen Antikörper gegen die Zielstruktur beschichtet. Darauf wird Zellkulturüberstand gegeben, aus dem das Antigen gebunden und so auf dem Plattenboden immobilisiert wird. Nachdem der restliche Kulturüberstand von der Platte gewaschen wurde, wird ein zweiter Antikörper zugegeben, der ebenfalls spezifisch an das Antigen bindet und der an eine Peroxydase gekoppelt ist. Die Peroxydase kann anschließend das Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) enzymatisch zu einem blauen Reaktionsprodukt umsetzen, dessen Menge photometrisch bestimmt wird. Die

Farbintensität ist dabei proportional zur Menge an Antigen, dass auf diese Weise mit Hilfe einer Standardkurve quantifiziert werden kann.

Um die Konzentrationen an IL-8 oder IL6 in Zellkulturüberständen zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst in Multiwell-Platten (48well, 250 µl Medium pro Vertiefung) für 18h stimuliert. Jede Stimulation wurde in Triplikaten durchgeführt. Anschließend wurden je 200 µl der Überstände vorsichtig abgenommen und entweder bis zur Verwendung bei -20°C oder bei sofortiger Verwendung auf Eis gelagert.

Für die Messung von IL-8 oder IL-6 wurden „Nunc-Immuno™ MaxiSorp™ 96-well-Flachbodenplatten“ (VWR International) und die Kits „Human IL-8 ELISA Set“ von BD Biosciences bzw. „Human IL-6 ELISA Ready-Set-Go“ von eBioscience entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Adsorptionen wurden im Plattenlesegerät „Infinite M200“ von Tecan gemessen.

Die Analyse der gemessenen Adsorptionen und die Berechnung der daraus resultierenden Zytokinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Software „Magellan 6.6“ durchgeführt. In den dargestellten Diagrammen wurden die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst (Mittelwert \pm Standardabweichung). Für das Erstellen der Diagramme und die statistische Analyse wurde die Software „Prism 5.0“ von GraphPad verwendet.

6.3.8 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum spezifischen Nachweis von Proteinen aus einem Proteingemisch. Er wurde in dieser Arbeit verwendet, um an NTHi gebundenes rekombinantes Galectin-3 im NTHi-Gesamtzelllysate nachzuweisen.

6.3.8.1 Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Page dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße. Das SDS bildet mit den Proteinen negativ geladene Komplexe, was eine elektrophoretische Auftrennung ermöglicht.

Zunächst wurden je 12 µl Probe mit 4 µl 4xProbenpuffer („4x Nupage LDS Sample Buffer“, Life Technologies GmbH) versetzt und für 5min im Thermoschüttler bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden diese Ansätze kurz zentrifugiert, auf Eis gestellt und dann vollständig in die Taschen eines Polyacrylamidgels („Miniprotean TGX“, 4-20% mit 15 Taschen von BioRad Laboratories, Inc.) überführt. Es wurde zunächst für 5 min eine Spannung von 130V angelegt bis die Proben vollständig ins Gel eingelaufen waren. Dann wurden die Proben für ca. 20 min bei 200V aufgetrennt.

6.3.8.2 Western Blot

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran, auf der sie durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert werden, wird allgemein als Western Blot bezeichnet. Dabei bleibt das im Gel erhaltene Trennmuster der Proteine erhalten, die mit Hilfe spezifischer Antikörper gefärbt und nachgewiesen werden können.

Nach der SDS-Gel-Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig entnommen und ohne Luftblasen auf eine Nitrozellulosemembran gelegt. Darüber und darunter wurden jeweils erst ein mit Transferpuffer getränktes Filterpapier und dann ein mit Transferpuffer getränkter Schwamm gelegt. Das erhaltene Sandwich wurde so in eine Blotvorrichtung geklemmt und in eine mit eiskaltem Transferpuffer gefüllte Blotkammer gestellt, dass die Membran sich zwischen dem Gel und der Anode befand. Der Proteintransfer erfolgte für 90 min bei 280 mA. Anschließend wurde die Effizienz des Transfers mittels einer Färbung mit „Ponceau S Lösung“ (30 s) überprüft. Nachdem die Membran durch mehrmaliges Waschen mit TBS wieder entfärbt wurde, erfolgte der Nachweis spezifischer Proteine (Galectin-3):

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 5% Milchpulver in TBS für 2 h bei Raumtemperatur auf einem taumelnden Plattformschüttler blockiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper zugegeben und mit der Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mehrmals in TBS-T gewaschen und dann für 1h mit dem an Peroxydase gekoppelten Sekundärantikörper in 5% Milch in TBS bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem mehrfachen Waschen, erst in TBS-T, dann in TBS, wurde „SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat“ auf die Membran gegeben. Dieses enthält Luminol und wird durch die Peroxydase in einer

Lumineszenzreaktion umgesetzt. Das dabei emittierte Licht wurde mit Hilfe des „FusionFx7“ (von PeQlab Biotechnologies) detektiert.

6.3.9 Messung der NF- κ B-Aktivierung in HEK293-Zellen

6.3.9.1 Transiente Transfektion von HEK293

Die transiente Transfektion der HEK293-Zellen mit Dectin-1, Card9 und Bcl10 wurde analog zu (Gross et al. 2006) durchgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml in 48well-Multiwellplatten ausgesät (250 μ l/well), so dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von ca. 60-70% hatten. Für die Transfektion wurde „GeneCellin Transfektionsreagenz“ (von BioCellChallenge) verwendet. Dazu wurde die Plasmid-DNA in DMEM ohne FBS verdünnt (50 μ l/well), dann GeneCellin (1 μ l/well) zugegeben, die Lösung 2-3 s gemixt und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden je 50 μ l des Transfektionsansatzes langsam in jedes well getropft. Für jeden Transfektionsansatz wurde eine Gesamtmenge von 350 ng/well verwendet (siehe Tabelle 27). Wenn diese Menge anhand der Plasmide mit den Zielgenen nicht erzielt werden konnte, wurde eine entsprechende Menge an Leervektor (pUNO1 mcs) zugegeben, um die Gesamtmenge zu erreichen.

Tabelle 27: Plasmidmengen transiente Transfektion HEK293

Zielgen	NF κ B-Reporter	Renilla-Luciferase	Dectin-1A	Card9	Bcl10	TLR2
ng/well	100	50	100	20	20	100

Am nächsten Tag wurde das Medium gegen FBS-freies Stimulationsmedium ausgetauscht und 24h nach der Transfektion wurden die Zellen mit NTHi (MOI1), dem Dectin-1/TLR2-Liganden Zymosan (100 μ g/ml) oder dem TLR2-Liganden Pam₃Cys (1 μ g/ml) für 5h stimuliert. Danach wurde das Medium abgesaugt und 50 μ l 1x Lysepuffer (aus dem Kit „Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity“ von Roche Applied Science) zugegeben. Nach einer 15minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Lysate über Nacht bei 4°C gelagert. Der Luciferase-Reporter-Assay wurde am folgenden Tag durchgeführt.

6.3.9.2 Luciferase-Reporter-Assay

Das NF- κ B-Reporter-Plasmid enthält sogenannte “Response Elements”, an die aktiviertes NF- κ B bindet. Dadurch wird die Expression eines Luciferasegens von *Photinus pyralis* induziert. Durch die Messung der enzymatischen Aktivität dieser Luciferase, die proportional ist zur Menge des exprimierten Enzyms, kann demnach die Stärke der NF- κ B-Aktivierung ermittelt werden. Für die Messung der Luciferaseaktivität wurde das Kit „Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity“ von Roche Applied Science verwendet. Dabei wurden je 10 μ l Lysat und 20 μ l Luciferase-Substrat in eine Vertiefung einer weißen 96well-Flachbodenplatte gegeben und zügig die Lumineszenz mit dem „Infinite M200“ Plattenlesegerät von Tecan gemessen. Zur Kontrolle wurden die Zellen auch mit einem *Renilla*-Plasmid transfiziert. Dieses codiert die *Renilla*-Luciferase, die konstitutiv exprimiert wird und deren Konzentration im Zelllysate daher Rückschlüsse auf die Transfektionseffizienz zulässt. Ihre Aktivität wurde mit Hilfe des „*Renilla*-Luciferase Assay Systems“ (von Promega Corporation) gemessen. Dazu wurden 10 μ l Lysat mit 10 μ l *Renilla*-Luciferase-Substrat in eine Vertiefung einer weißen 96well-Flachbodenplatte gegeben und zügig die Lumineszenz mit dem „Infinite M200“ Plattenlesegerät gemessen. Zuletzt wurden die Ergebnisse der Luciferase-Messung auf die Werte der *Renilla*-Luciferase-Messung normalisiert und dann als „Relative Lichteinheiten“ (RLU, *engl.* Relative light units) angegeben.

6.4 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikanzen wurden mittels „beidseitigem One-way ANOVA Test“ mit „Bonferroni-Posttest“ ermittelt. Ein p-Wert $< 0,05$ wird als signifikant angenommen (*p $<0,05$ **p $<0,01$ ***p $<0,001$). Für die statistische Analyse der qPCR-Daten wurde die Software „Rest 2009“ verwendet, für alle anderen statistischen Analysen die Software „Prism5.0“ von GraphPad.

7 Ergebnisse

7.1 Die Expression von Dectin-1 im humanen Lungenepithel

7.1.1 Dectin-1 wird sowohl auf humanem Alveolar- als auch Bronchialepithel und der Pleura exprimiert

Das Expressionsmuster von Dectin-1 in der humanen Lunge wurde mit Hilfe von immunhistochemisch gefärbten Lungenbiopsien analysiert. Die Lungenschnitte stammen aus 19 Spendern (Patienteneigenschaften siehe Tabelle 1), bei denen aufgrund einer Krebserkrankung eine Lungensektion durchgeführt wurde. Einverständniserklärungen der Patienten sowie die Zustimmung der Ethikkommission wurden eingeholt. Zur Analyse wurden nicht veränderte Gewebe verwendet. Sie wurden nach Formalin-Fixierung und Einbettung in Paraffin mit einem spezifischen Dectin-1-Antikörper (Klon MAB1859, 25 µg/ml) oder einem IgG Kontrollantikörper gefärbt.

In den Proben von 17 der 19 Patienten konnte eine Expression von Dectin-1 im Lungengewebe nachgewiesen werden (siehe Tabelle 28). Abbildung 3 zeigt repräsentative Proben, die die Färbung von Bronchialepithel, Alveolarepithel und Pleura zeigen. Die apikale Seite des Bronchialepithels und das Alveolarepithel zeigten in den meisten Proben eine deutliche Dectin-1-Färbung. Die Pleura war in allen getesteten Spendern positiv für Dectin-1 gefärbt.

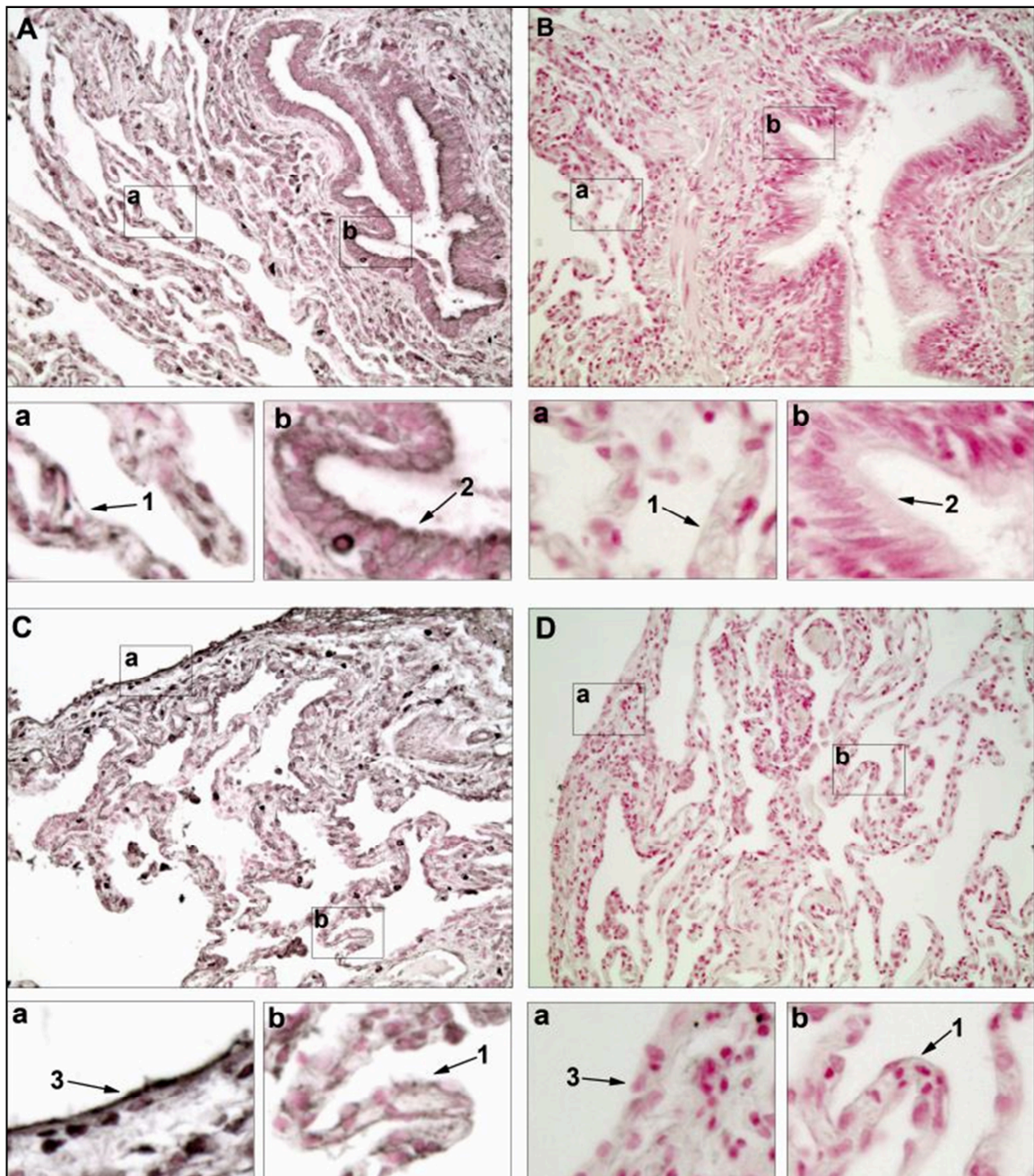


Abbildung 3: Expression von Dectin-1 in der humanen Lunge. (A, C) Dectin-1-Färbung, (B, D) IgG Kontrollfärbung mittels Immun-Peroxydase Technik. Die Bilder wurden bei einer optischen Vergrößerung von 200fach aufgenommen. Die kleineren, mit a und b gekennzeichneten Kästchen zeigen Ausschnittvergrößerungen der jeweiligen Aufnahmen. Die Pfeile deuten auf bestimmte Gewebe hin: 1 Alveolarepithel, 2 Bronchialepithel, 3 Pleura.

Die Anzahl der positiv gefärbten Proben im Hinblick auf die betrachteten Gewebetypen (Alveolarepithel, Bronchialepithel und Pleura) ist in Tabelle 28 angegeben. Um den Grad der Dectin-1-Expression zu analysieren, wurde die Intensität der Färbung in einem Bereich von 0 für keine Färbung bis 3 für starke Färbung relativ zur Isotypkontrolle beurteilt. In

Tabelle 28 ist für jedes Lungengewebe die Anzahl der Proben pro Intensitätsgrad aufgeführt. Daraus wird ersichtlich, dass das Bronchialepithel generell etwas stärker gefärbt war als das Alveolarepithel. Die Pleura wies die intensivste Färbung auf.

Tabelle 28: Auswertung der immunhistochemischen Färbung der Lungenschnitte.

	Alveolarepithel	Bronchialepithel	Pleura
Dectin-1-positive Proben* (Anzahl positive Proben / Gesamtzahl Proben)	17 / 19	14 / 16	19 / 19
Intensität der Färbung (Anzahl positive Proben / Gesamtzahl Proben)			
0(keine Färbung)	2 / 19	2 / 16	0 / 19
1(geringe Intensität)	7 / 19	1 / 16	2 / 19
2(mittlere Intensität)	10 / 19	10 / 16	6 / 19
3(starke Intensität)	0 / 19	3 / 16	11 / 19

*Da in den Proben einiger Patienten keine Bronchien zu finden waren, wird hier jeweils die Anzahl der positiven Proben mit der Gesamtanzahl an Proben angegeben.

7.1.2 Die Expression von Dectin-1 ist nicht mit einer COPD-Erkrankung oder dem Raucher-Status assoziiert

Basierend auf dem Intensitätsgrad der Dectin-1-Färbung wurde die Dectin-1-Expression in den Lungenschnitten von Spendern hinsichtlich einer COPD-Erkrankung (Abbildung 4A) oder dem Raucherstatus (Raucher/Ex-Raucher/Nichtraucher; Abbildung 4B) verglichen. Dabei konnten unter Verwendung des One-way ANOVA Tests keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Um die Beziehung zwischen dem Konsum von Tabakrauch und der Expression von Dectin-1 näher zu betrachten, wurde die Intensität der Dectin-1-Färbung mit den Packungsjahren (täglich gerauchte Zigarettenpackungen multipliziert mit der Anzahl der Jahre als Raucher; Abbildung 4C) verglichen. Auch hier wurde keine Korrelation gefunden. Des Weiteren wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Level an C-reaktivem Protein (CRP) als Marker für Inflammation und der Expression von Dectin-1 besteht (Abbildung 4D). Auch hier konnte keine Korrelation festgestellt werden. Obwohl eine Tendenz zu sehen war, dass die Intensität der Dectin-1-Färbung auf dem Bronchialepithel mit erhöhtem CRP-Wert einhergeht, war dies nicht statistisch signifikant.

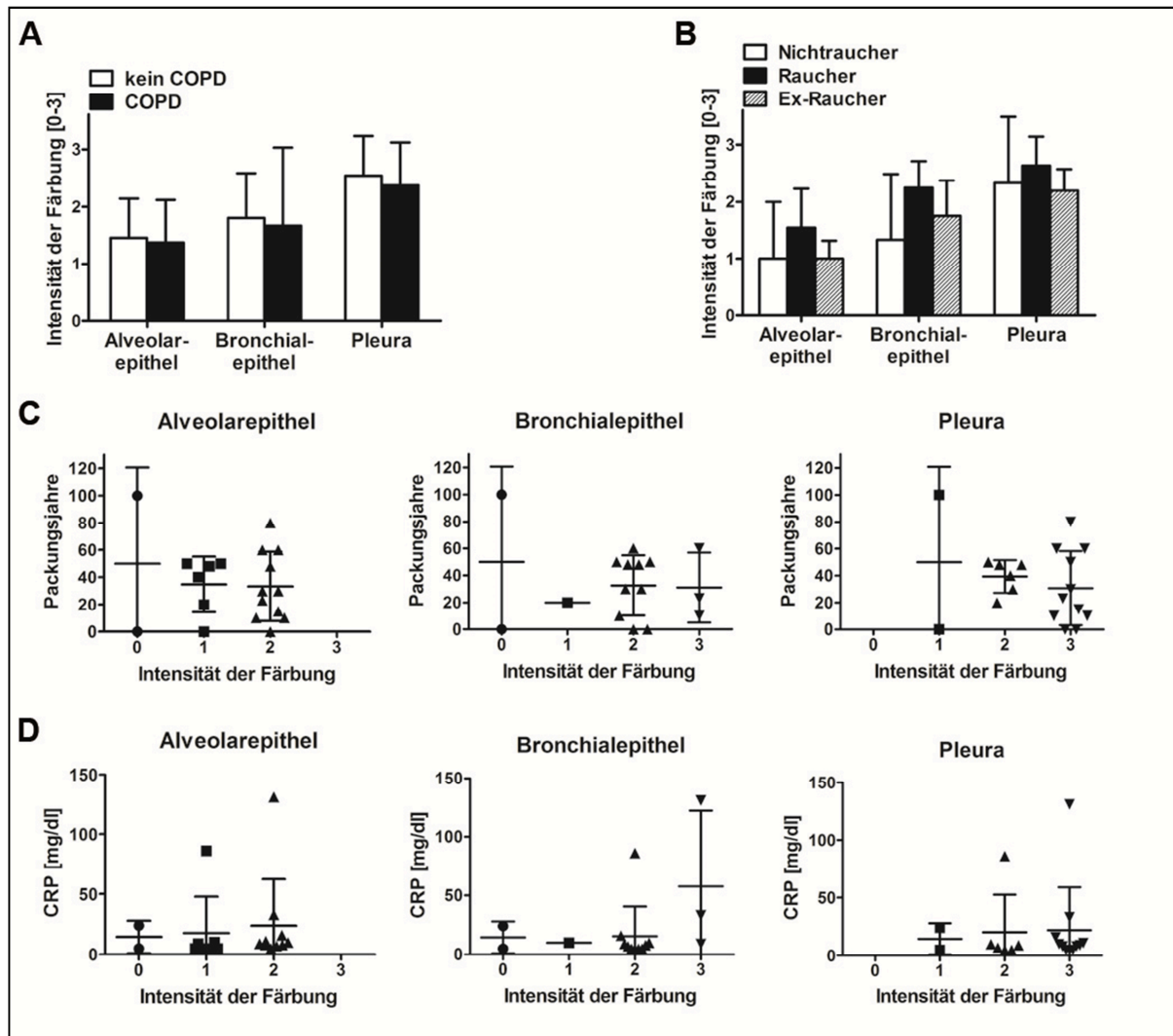


Abbildung 4: Die Dectin-1-Expression in der humanen Lunge ist nicht assoziiert mit dem Vorliegen einer COPD, dem Raucherstatus oder dem CRP-Level im Blut. Statistische Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Lungenschnitte:keine Korrelation der Intensität der Dectin-1-Färbung mit einer COPD (A),keine Korrelation der Intensität der Dectin-1-Färbung mit dem Raucherstatus (B),keine Korrelation der Intensität der Dectin-1-Färbung mit den Packungsjahren (C) undkeine Korrelation der Dectin-1-Färbung mit dem CRP-Level im Blut (D).

7.1.3 Die Expression von Dectin-1 in primären Bronchialepithelzellen wird durch Interferone und TLR3 gesteigert

Um zu untersuchen, wodurch die Expression von Dectin-1 auf humanen Bronchialepithelzellen reguliert wird und welche Isoformen eine Rolle spielen, wurden primäre Bronchialepithelzellen (NHBE) mit verschiedenen *Toll-like*-Rezeptor-Agonisten (TLR2/6-Agonist Malp2, TLR3-Agonist PolyI:C und TLR5-Agonist Flagellin; je 100 ng/ml), TNF α (100 ng/ml), Interferonen (IFN α , IFN β oder IFN γ ; je 100 ng/ml) oder NTHi (MOI 100) stimuliert und die Menge an Dectin-1-mRNA gemessen. In Abbildung 5A wurde ein Primerpaar verwendet (36 Zyklen), das komplementär zum ersten und letzten Exon ist, so dass jede Dectin-1-*Splicing*-Variante eine andere Bandengröße aufweist. Alle Varianten wurden infolge einer Stimulation der Zellen mit dem TLR3-Agonisten PolyI:C sowie mit IFN α , IFN β und IFN γ gleichermaßen verstärkt exprimiert. Um die Funktionalität der verwendeten Substanzen zu überprüfen, wurde per qPCR die induzierte Expression von IL-8 mRNA gemessen (Abbildung 5D). Malp-2, Flagellin, TNF α , IFN γ und NTHi induzierten eine statistisch signifikante Expression von IL-8. Die zu beobachtende Zunahme an IL-8 mRNA durch PolyI:C war statistisch nicht signifikant ($p=0,065$). Auch IFN α und IFN β hatten keinen signifikanten Effekt auf die IL-8 Expression. Da sie jedoch einen eindeutigen Effekt auf die Dectin-1-Expression hatten, ist dennoch davon auszugehen, dass die Funktionalität der Substanzen gegeben war. Eine Stimulation der Zellen mit dem TLR2/1 Agonisten Pam₃Cys (100 μ g/ml) induzierte ebenfalls keine IL-8 Expression (Abbildung 5D). Da dieser Agonist offensichtlich nicht in der Lage ist, die Zellen zu stimulieren, und er auch keinen Effekt auf die Dectin-1-Expression ausübte (Daten nicht gezeigt) wurde er in die anderen Darstellungen (Abbildung 5A-C) nicht aufgenommen.

Zur Identifizierung der Dectin-1-*Splicing*-Varianten wurden die prominentesten Banden ausgeschnitten und sequenziert (Ergebnisse der Sequenzierung siehe Tabelle 29). Es konnten insgesamt fünf verschiedene *Splicing*-Varianten identifiziert werden. In Abbildung 6 (modifiziert nach Willment et al. 2001) sind diese bildlich dargestellt. Am stärksten ist die Bande bei 593 bp, die als *Splicing*-Variante Dectin-1B identifiziert werden konnte. Desweiteren wurde Variante Dectin-1D gefunden (474 bp). Die Banden bei 680 bp (NEU1) und 561 bp (NEU2) konnten als bisher noch nicht beschriebene *Splicing*-Varianten identifiziert werden. Sie wurden analog zu der Abbildung aus Willment et al. (2001) in

Abbildung 6 hinzugefügt. Sie ähneln beide der *Splicing*-Variante Dectin-1G (siehe Abbildung 6) wie sie bei Willment et al. (2001) beschrieben wurde (Referenz: Nukleotidsequenz Ensembl CLEC7A-006), allerdings fehlt ihnen Exon 3, das die Halsregion des Proteins codiert. *Splicing*-Variante Dectin-1G sowie die beiden neuen *Splicing*-Varianten zeichnen sich durch ein kurzes Exon (4') aus, das in den anderen Varianten nicht vorkommt. Am Ende dieses Exons liegt ein Stopp-Codon, welches zu einem verkürzten Protein führt. Weitere Unterschiede zu *Splicing*-Variante Dectin-1G sowie untereinander weisen die beiden Varianten NEU1 und NEU2 erst hinter dem Stopp-Codon auf. So verfügt *Splicing*-Variante NEU1 im Gegensatz zu Variante NEU2 über Exon 5. Demnach codieren beide neuen *Splicing*-Varianten für das gleiche Peptid, das sich von Isoform Dectin-1G nur durch das Fehlen der Halsregion unterscheidet.

Zuletzt konnte auch Bande 1 (731 bp) eindeutig zugeordnet werden: Es handelt sich hierbei um *Splicing*-Variante Dectin-1A. Diese Bande ist von allen identifizierten Banden die schwächste. Dies könnte technisch bedingt sein, da die Bande länger ist als die anderen. Die Polymerase braucht folglich für eine Amplifikation der *Splicing*-Variante Dectin-1A mehr Zeit als für die kürzeren Varianten wodurch sie möglicherweise weniger effektiv amplifiziert wird. Um also zu klären, ob der Unterschied in der Bandenstärke die Mengenverhältnisse an mRNA in den Zellen widerspiegelt oder eine technische Ursache hat, wurden PCRs mit Primerpaaren durchgeführt, die spezifisch für *Splicing*-Variante Dectin-1A oder Dectin-1B sind. Die unstimulierten Zellen wiesen hinsichtlich der Dectin-1A-Expression einen CT-Wert auf, der zu hoch war um eine zuverlässige Quantifizierung der Menge an mRNA mittels qPCR zu gewährleisten. Deshalb wurde stattdessen eine semiquantitative PCR durchgeführt (36 Zyklen; Abbildung 5B). Analog zu Abbildung 5A ist hier eine Steigerung der Dectin-1A-Expression nach Stimulation der NHBE-Zellen mit PolyI:C, IFN α , IFN β und IFN γ zu sehen. Die Expression von Dectin-1B-mRNA war etwas stärker und konnte deshalb mittels qPCR quantifiziert werden (Abbildung 5C). Hierbei bestätigte sich ebenfalls das Ergebnis aus Abbildung 5A, dass PolyI:C, IFN α , IFN β und IFN γ die Expression von Dectin-1B statistisch signifikant gesteigert haben.

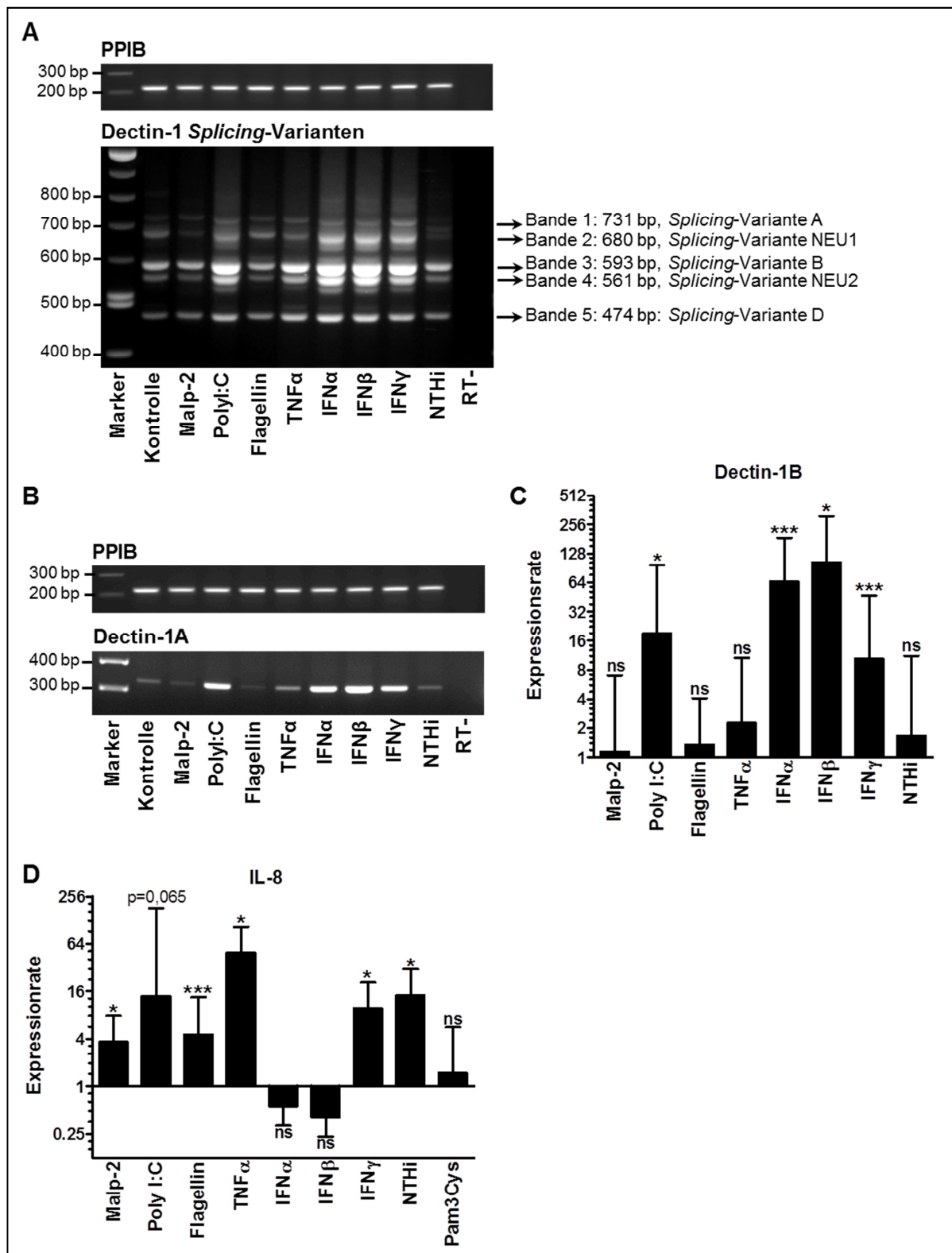


Abbildung 5: Die Regulation der Expression der Dectin-1-*Splicing*-Varianten in NHBE-Zellen(A) Die Expression der Dectin-1-*Splicing*-Varianten in NHBE-Zellen nach Stimulationen mit verschiedenen *Toll-like*-Rezeptor-Agonisten oder Chemokinen (siehe x-Achse) für 24 h sowie die Expression des Haushaltsgens PPIB als Kontrolle der eingesetzten RNA-Menge; semiquantitative PCR (PPIB: 28 Zyklen, Dectin-1-*Splicing*-Varianten: 36 Zyklen); (B) Die Regulation der Expression von *Splicing*-Variante Dectin-

1A in NHBE-Zellen nach Stimulation (siehe x-Achse); semiquantitative PCR (Dectin-1A: 36 Zyklen); (C) Die Regulation der Expression von *Splicing*-Variante Dectin-1B in NHBE-Zellen nach Stimulation (siehe x-Achse), qPCR; (D) IL-8 Expression der stimulierten NHBE-Zellen; qPCR. Die semiquantitativen PCRs zeigen jeweils ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten. Die qPCRs zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von je drei unabhängigen Experimenten. Expression Ratio – vielfache Expression relativ zu unbehandelten Zellen; ns-nicht signifikant; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

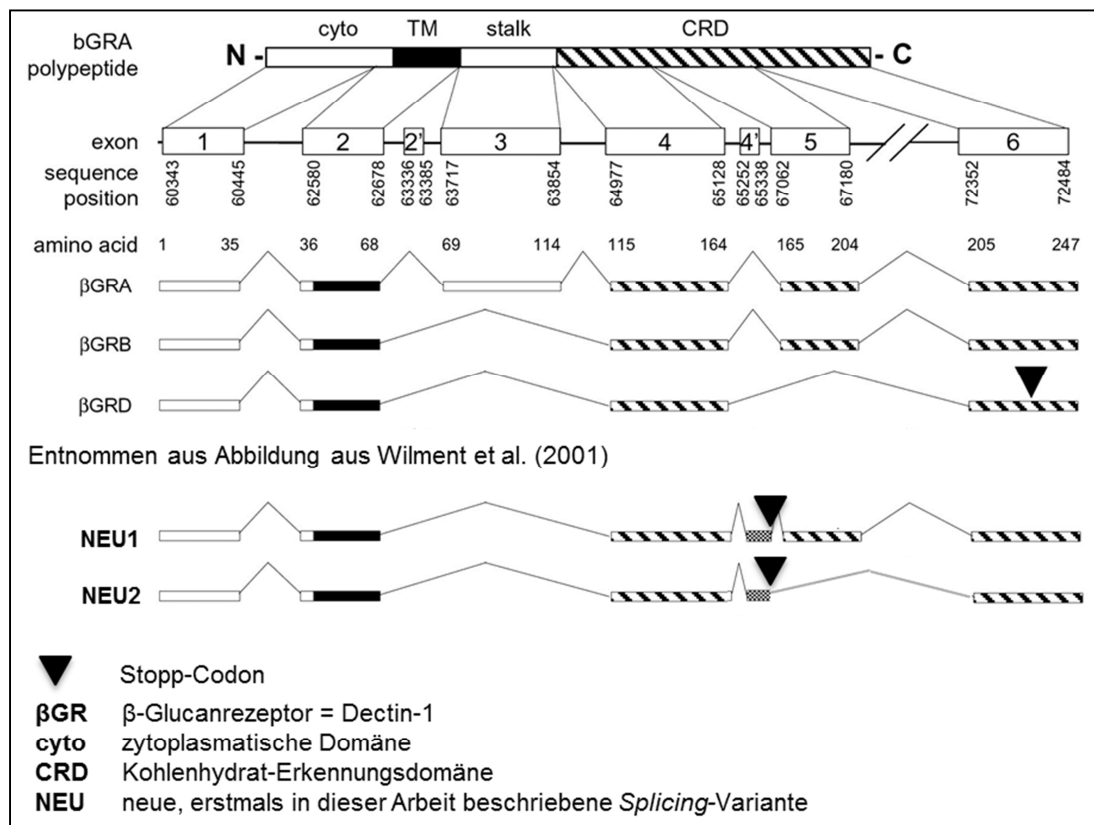


Abbildung 6: Dectin-1-*Splicing*-Varianten, modifiziert nach Wilment et al. 2001. Im oberen Teil der Abbildung ist dargestellt, für welchen Bereich des Proteins die jeweiligen Exons codieren. Darunter sind die in Wilment et al. 2001 beschriebenen und in NHBE-Zellen identifizierten Dectin-1-*Splicing*-Varianten dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung wird analog zu der Abbildung aus Wilment et al. 2001 der schematische Aufbau der beiden neu identifizierten Dectin-1-*Splicing*-Varianten (NEU1 und NEU2) aufgeführt.

7.2 Die Bedeutung von Dectin-1 für die pro-inflammatorische Immunantwort humaner Lungenepithelzellen gegen NTHi

Um zu untersuchen, ob Dectin-1 für die pro-inflammatorische Immunantwort gegen NTHi eine Rolle spielt, wurden zunächst NHBE-Zellen von vier verschiedenen Spendern, die Dectin-1 auf ihrer Oberfläche exprimierten (repräsentatives Beispiel siehe Abbildung 7A), verwendet. Der für die Durchflusszytometrie verwendete Dectin-1-Antikörper GE2 erkennt die beiden funktionalen Isoformen A und B (Willment et al. 2005). Zunächst wurde die Interaktion von Dectin-1 mit potentiellen Liganden nach Vorinkubation der Zellen mit dem inhibitorischen Antikörper MAB1859 (20 µg/ml) oder dem Dectin-1-spezifischen Inhibitor Laminarin (1 mg/ml), einem kurzen β -1,3-Glucan, untersucht. Dazu wurden die Zellen nach der Dectin-1-Inhibition entweder mit Zymosan, einem bekanntem Dectin-1- und TLR2-Agonisten, oder einem von zwei verschiedenen NTHi-Stämmen stimuliert und nach 18 h die Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IL-8 (Abbildung 7B) und IL-6 (Abbildung 7C) im Überstand mittels ELISA gemessen. Die Zugabe des jeweiligen Inhibitors oder eine entsprechende Menge PBS ohne anschließende Stimulation der Zellen wurde als Negativkontrolle verwendet. Um zu zeigen, dass die Dectin-1-Inhibition mit den verwendeten Inhibitoren erfolgreich ist, wurde Zymosan, eine Zellwandpräparation von *S. cerevisiae*, als bekannter Dectin-1-Ligand verwendet. Da die Zellen verschiedener Spender in unterschiedlichem Maß Interleukine sekretierten, wurden die Ergebnisse jeweils auf die Stimulationskontrolle (Stimulation mit dem jeweiligen Liganden ohne Dectin-1-Inhibition) normalisiert. Zymosan, NTHi 2019 und NTHi 86-028 stimulierten die Sekretion einer vergleichbaren Menge IL-8 und IL-6. Die IL-8-Konzentration im Überstand der ohne Dectin-1-Inhibitor stimulierten Zellen variierte zwischen ca. 3 und 30 ng/ml, die IL-6-Konzentration zwischen ca. 30 und 400 pg/ml. Wie in Abbildung 7B und 7C ersichtlich wird, führte die Inhibition von Dectin-1 zu einer signifikanten Verminderung der IL-8- und IL-6-Sekretion der Zellen nach Stimulation mit Zymosan und beiden NTHi-Stämmen. Um einen unspezifischen Effekt der beiden verwendeten Dectin-1-Inhibitoren ausschließen zu können, wurden NHBE-Zellen von drei verschiedenen Spendern, die keine Dectin-1-Expression aufwiesen (Abbildung 8A) der gleichen Behandlung unterzogen. Im Gegensatz zu den Zellen mit Dectin-1 konnte hier keine signifikante Reduktion der IL-8 Sekretion nach Stimulation mit Zymosan oder NTHi durch Zugabe der Dectin-1-Inhibitoren nachgewiesen werden (Abbildung 8B).

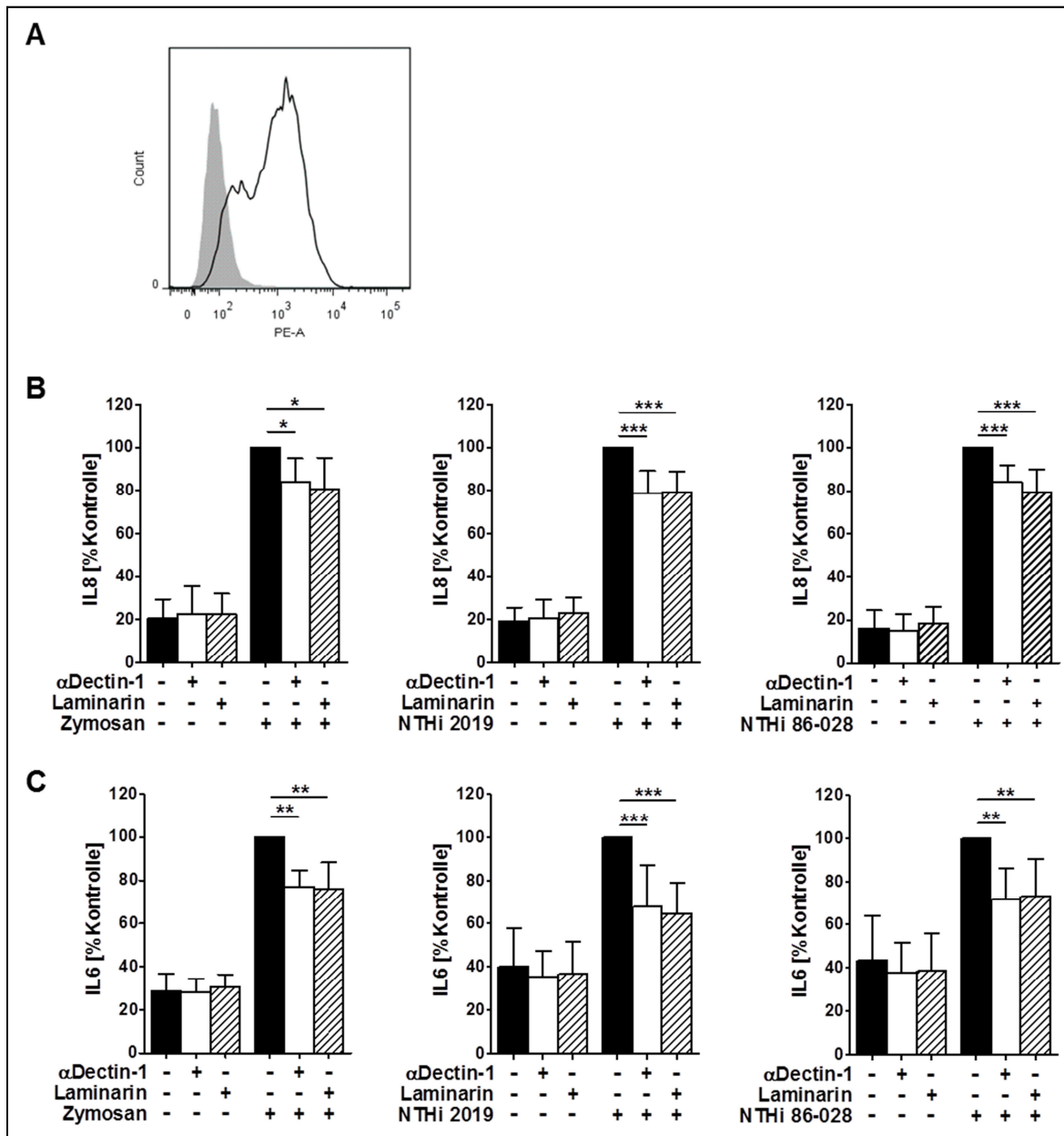


Abbildung 7: Dectin-1-Abhängigkeit der pro-inflammatorischen Immunantwort von NHBE-Zellen nach Stimulation mit NTHi (A) Nachweis der Dectin-1-Expression auf den verwendeten NHBE-Zellen (Durchflusszytometrie, grau ausgefülltes Histogramm PE-Sekundär-Antikörper-Kontrolle, schwarze Linie Dectin-1-Färbung). Die Zellen stammen von einem repräsentativen Spender von 4. (B) IL-8 Antwort (ELISA) nach Stimulation mit Zymosan (links, 100 µg/ml), NTHi 2019 (Mitte, MOI 100) und NTHi 86-028 (rechts, MOI 100) und der Inhibition von Dectin-1 mit Dectin-1-Antikörper (MAB1859, 20 µg/ml) oder Laminarin (1mg/ml); (C) IL-6 Antwort (ELISA) nach Stimulation mit Zymosan (links, 100 µg/ml), NTHi 2019 (Mitte, MOI 100) und NTHi 86-028 (rechts, MOI 100) und der Inhibition von Dectin-1 mit Dectin-1-Antikörper (MAB1859, 20 µg/ml) oder Laminarin (1 mg/ml). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung von mindestens vier unabhängigen Experimenten. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

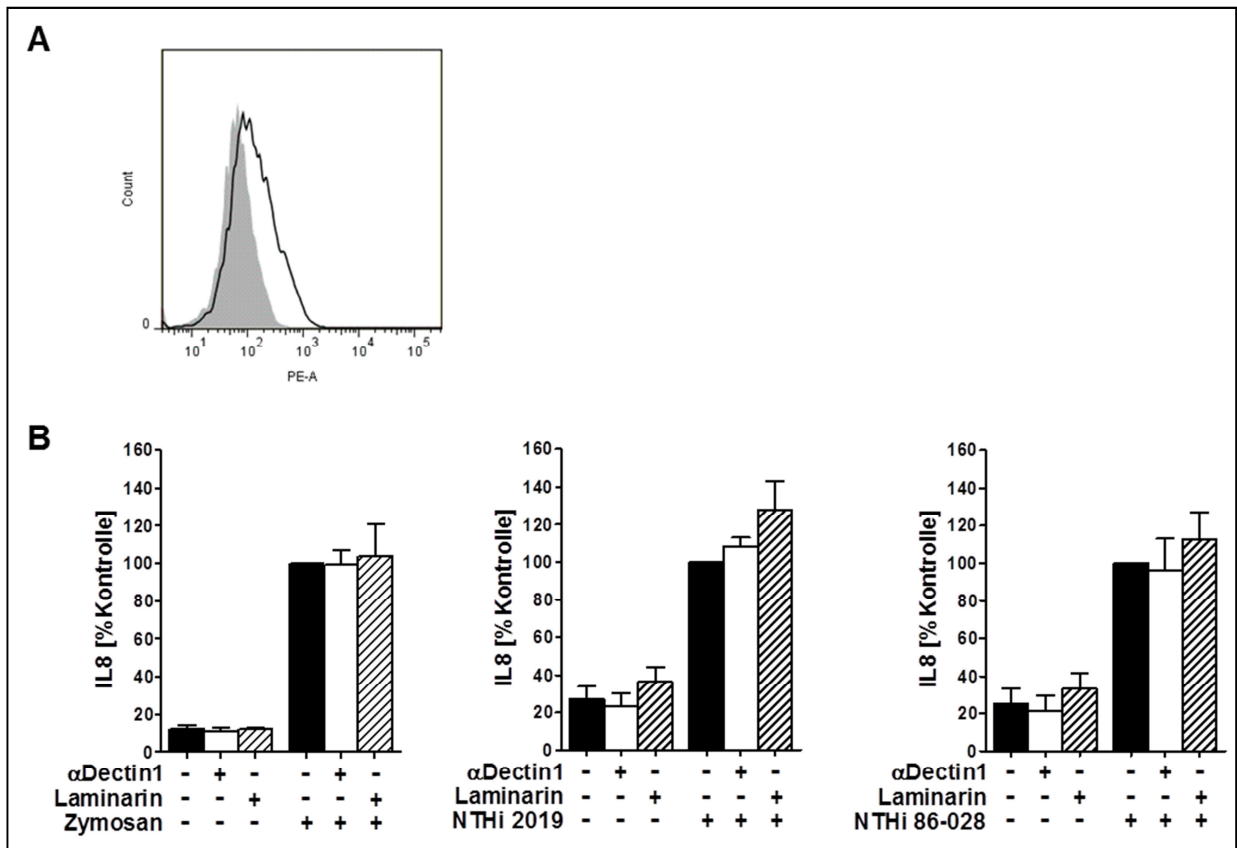


Abbildung 8: Dectin-1-Abhängigkeit der pro-inflammatorischen Immunantwort von NHBE-Zellen, die keine Dectin-1-Expression zeigten, nach Stimulation mit NTHi (A) Nachweis der Dectin-1-Expression auf den verwendeten NHBE-Zellen (Durchflusszytometrie, grau ausgefülltes Histogramm PE-Sekundär-Antikörper-Kontrolle, schwarze Linie Dectin-1-Färbung); ein repräsentatives Experiment von drei. (B) IL-8 (ELISA) Antwort nach Stimulation der NHBE-Zellen mit Zymosan (links, 100 μ g/ml), NTHi 2019 (Mitte, MOI 100) und NTHi 86-028 (rechts, MOI 100) nach Dectin-1-Inhibition mit einem inhibitorischen Dectin-1-Antikörper (MAB1859, 20 μ g/ml) oder Laminarin (1 mg/ml). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

7.3 Untersuchung der beteiligten Signalwege der Dectin-1-abhängigen Immunantwort gegen NTHi in humanen Lungenepithelzellen

7.3.1 Untersuchung der Bedeutung der Isoformen Dectin-1A und Dectin-1B und der hemITAM-Signaldomäne

Für die Untersuchung, ob verschiedene Dectin-1-Isoformen eine unterschiedliche Bedeutung für die pro-inflammatorische Immunantwort gegen NTHi haben, insbesondere hinsichtlich der Halsregion mit der Glykolysierungsstelle, wurden die Isoformen Dectin-1A und Dectin-1B in A549-Zellen, die normalerweise kaum Dectin-1 aufweisen, überexprimiert. Dazu wurden die Zellen mit Plasmiden stabil transfiziert, die Dectin-1A oder Dectin-1B kodieren. Für einen weiteren Untersuchungsansatz wurden A549-Zellen mit einem Expressionsplasmid für Dectin-1A mit einer mutierten Phosphorylierungsstelle in der hemITAM-Signaldomäne (Dectin-1A_Y3:15F) stabil transfiziert. In diesem Peptid sind die beiden Tyrosine an Position 3 und 15 durch je ein Phenylalanin ersetzt worden, so dass die Signaldomäne des Rezeptors nicht mehr phosphoryliert werden kann. Zur Kontrolle der Auswirkungen der Transfektion auf das Verhalten der Zellen wurden A549-Zellen mit dem Vektor ohne Dectin-1-Gen transfiziert (A549-Vektor). Die Expression von Dectin-1 auf der Oberfläche der stabil transfizierten A549-Zellen wird in Abbildung 9A dargestellt. Die somit verschiedenen Formen von Dectin-1 exprimierenden A549-Zellen wurden mit NTHi für 18 h stimuliert und die IL-8 Sekretion in den Überständen mittels ELISA quantifiziert. Wie Abbildung 9B zeigt, wurde die durch NTHi induzierte IL8-Sekretion durch Dectin-1A signifikant verstärkt. Die Expression von Dectin-1B hingegen hatte keinen Einfluss auf die IL-8-Antwort auf NTHi. Die Expression von Dectin-1A_Y3:15F hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die IL-8-Sekretion.

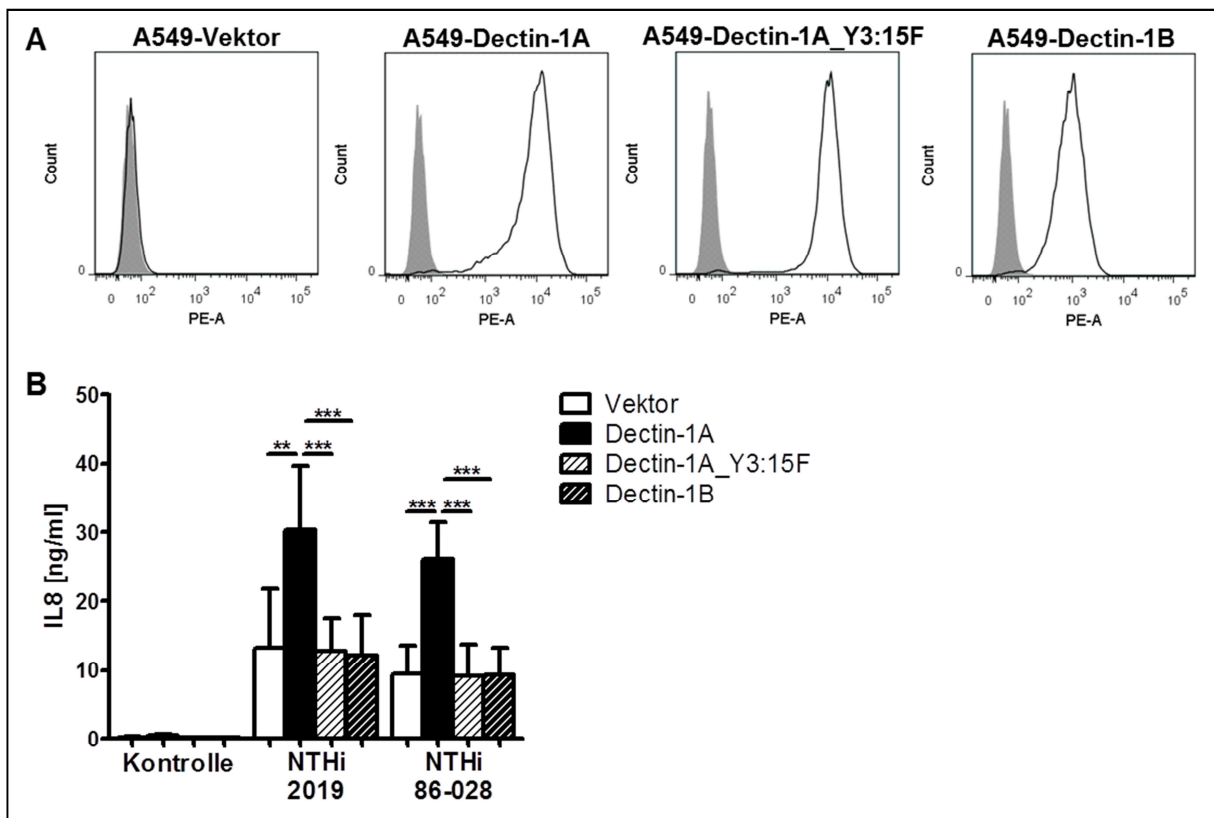


Abbildung 9: Dectin-1A verstärkt phosphorylierungsabhängig die IL-8 Antwort von A549-Zellen auf NTHi (A) Die Dectin-1-Expression der mit verschiedenen Dectin-1-Formen stabil transfizierten A549-Zellen (Durchflusszytometrie, grau ausgefülltes Histogramm PE-Sekundär-Antikörper-Kontrolle, schwarze Linie Dectin-1-Färbung); (B) IL-8 Sekretion(ELISA) der stabil transfizierten A549-Zellen nach Stimulation mit NTHi (Stamm 2019 oder 86-028, MOI 100). Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert mit Standardabweichung von sechs unabhängigen Experimenten. **p<0,01; ***p<0,001

7.3.2 Die Bedeutung der NF-κB-Aktivierung für die NTHi-induzierte Dectin-1-Signalkaskade

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB ist für die Signalwege, die infolge einer Aktivierung von Dectin-1 induziert werden, von zentraler Bedeutung (siehe Abbildung 2, S. 20). Um zu analysieren, ob eine Bindung der Untereinheit p65 von NF-κB an den IL8-Promotor nach einer NTHi-Stimulation Dectin-1-abhängig erfolgt, wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) durchgeführt (Abbildung 10). Dafür wurden A549-Vektor- und A549-Dectin-1-Zellen für 1 h mit NTHi stimuliert. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurden Polymerase II, als Indikator für eine Expression des IL-8-Gens, und NF-κB-Untereinheit p65, als Indikator für eine NF-κB-Aktivierung, präzipitiert. Danach wurde in

einer PCR mit spezifischen Primern gegen den IL-8-Promotor nachgewiesen, ob dieser an Polymerase II oder p65 gebunden und somit co-präzipitiert wurde. Wie in Abbildung 10 zu sehen, bindet die Polymerase II zu diesem Zeitpunkt in den stimulierten A549-Vektor-Zellen nicht eindeutig stärker an den IL-8-Promotor als in den unstimulierten Zellen. Bei A549-Dectin-1A ist dagegen in den stimulierten Zellen bereits eine deutliche Bindung von Polymerase II nachzuweisen. p65 bindet nach Stimulation mit NTHi in beiden Zelllinien mehr an den IL-8-Promotor als in unstimulierten Proben. Dabei bindet in den stimulierten A549-Dectin-1A-Zellen deutlich mehr p65 als in den stimulierten A549-Vektor-Zellen. Die Überexpression von Dectin-1A verstärkt daher die NF- κ B-abhängige IL-8 Expression nach Stimulation mit NTHi.

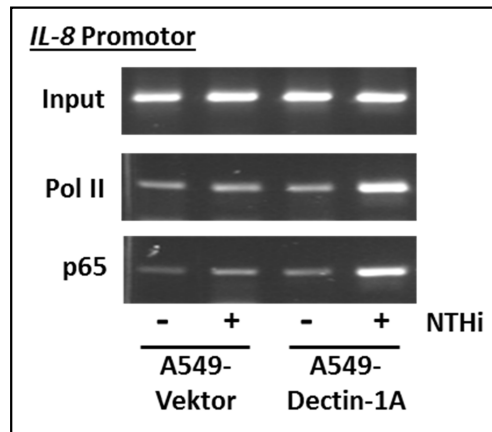


Abbildung 10: ChIPdes IL-8 Promotors mit der Polymerase II (Pol II) und der NF- κ B Untereinheit p65 nach Stimulation der A549-Dectin-1A-Zellen mit NTHi (PCR mit 38 Zyklen, Input 32 Zyklen). Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

7.3.3 Die Bedeutung der Syk-Kinase und des Card9/Bcl10/Malt1-Signalosoms für die Dectin-1-abhängige Immunantwort auf NTHi in humanen respiratorischen Epithelzellen

Abbildung 11A zeigt, dass Syk, Card9, Bcl10 und Malt1 in NHBE-Zellen exprimiert werden (mRNA). Um die Beteiligung von Syk an der Dectin-1-abhängigen Immunantwort gegen NTHi in diesen Zellen zu untersuchen, wurde der Inhibitor PP2 (4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine) verwendet. Dieser inhibiert die Tyrosinkinasen der Src-Familie (Underhill et al. 2005). Eine Vorinkubation der Zellen mit 20 μ M dieses Inhibitors reduzierte die Menge an sekretiertem IL-8 im Zellkulturüberstand nach Stimulation mit NTHi auf das Niveau unstimulierter Zellen. Daher ist davon auszugehen, dass ein großer Teil der NTHi-abhängigen IL-8-Sekretion, inklusive des Dectin-1-abhängigen Anteils, in NHBE-Zellen durch Syk oder Src-Kinasen vermittelt wird.

A549-Zellen dagegen exprimieren weder Syk noch Card9 oder Bcl10 (Abbildung 11A). Hier kann also keine Signaltransduktion über Syk und das Card9/Bcl10/Malt1-Signalosom stattfinden. Wie Abbildung 9B zeigt, ist Dectin-1A dennoch in der Lage die IL-8-Antwort auf NTHi zu verstärken, Dectin-1B dagegen nicht. Um zu untersuchen, ob dies auf das Fehlen von Syk, Card9 und Bcl10 zurückzuführen ist, wurden die Zellen A549-Dectin-1A und A549-Dectin-1B transient mit Syk, Card9/ Bcl10 oder Syk und Card9/ Bcl10 transfiziert und der Einfluss auf die Menge an sekretiertem IL-8 nach Stimulation mit NTHi gemessen (ELISA). Wie Abbildung 11C zeigt, hatten weder Syk noch Card9/ Bcl10 einen signifikanten Einfluss auf die IL-8 Sekretion in Zellen mit Dectin-1A oder Dectin-1B.

Um die Bedeutung des Card9/Bcl10/Malt1-Signalosoms näher zu untersuchen wurden als zusätzliches Zellkulturmodell die HEK293-Zellen herangezogen. Diese wurden analog zu Gross et al. transient mit Card9/Bcl10 und/ oder Dectin-1A sowie einem NF- κ B-Reporter-Plasmid transfiziert und der Grad der NF- κ B-Aktivierung anhand eines Luciferase-Reporter-Assays bestimmt (Gross et al. 2006). Wie in Abbildung 11D zu sehen ist, führte selbst die Stimulation der Zellen, die nur mit dem nichtkodierenden Kontrollvektor transfiziert waren, bereits zu einer deutlichen NF- κ B-Aktivierung. Darüber hinaus hatten weder Dectin-1 alleine noch Dectin-1 zusammen mit Card9/ Bcl10 einen Effekt auf die NF- κ B-Aktivierung durch NTHi. Da auch Zymosan hier keine Dectin-1-abhängige Aktivierung bewirkt, ist davon auszugehen, dass den Zellen ein weiterer, essentieller, aber bisher nicht

bekannter, Bestandteil der Signalkette oder Co-Rezeptor fehlt, um eine effektive Dectin-1-abhängige NF- κ B-Aktivierung zu induzieren.

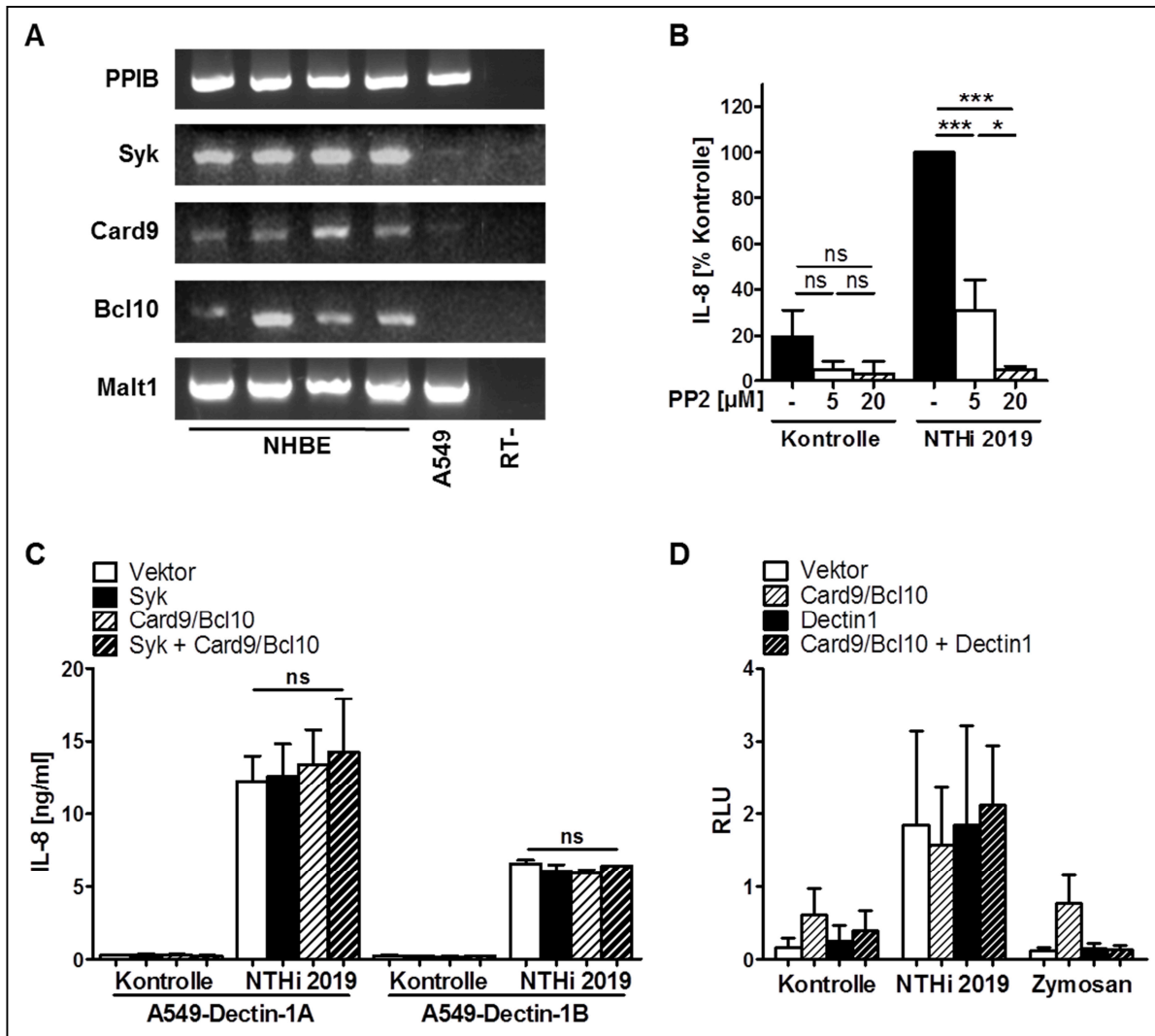


Abbildung 11: Die Bedeutung der Syk-Kinase und des Card9/Bcl10/Malt1-Signalsoms. (A) Die Expression von mRNA von Syk (28 Zyklen), Card9 (34 Zyklen), Bcl10 (34 Zyklen) und Malt1 (36 Zyklen) in NHBE- und A549-Zellen im Vergleich zum Haushaltsgen PPIB (28 Zyklen), semiquantitative PCR; (B) NTHi-induzierte IL-8-Sekretion von NHBE-Zellen nach Syk- und Src-Inhibition mit PP2 (ELISA); Das Diagramm zeigt Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. (C) Die NTHi-induzierte IL-8-Sekretion von A549-Dectin-1A- und A549-Dectin-1B-Zellen nach transienter Transfektion mit Syk und/oder Card9/Bcl10 (ELISA); Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. (D) Die NTHi-induzierte NF- κ B-Aktivierung in nach dem Vorbild von Gross et al. 2006 transient transfizierten HEK293-Zellen (Luciferase-Assay, RLU – „relative light units“). ns nicht signifikant; *p<0,05; ***p<0,001

7.3.4 Die Bedeutung der Raf-1-Kinase für die NTHi-induzierte Dectin-1-Signalkaskade

Wie Gringhuis et al. beschrieben haben, wird die Dectin-1-induzierte NF- κ B-Aktivierung auch über die Raf-1-Kinase vermittelt (Gringhuis et al. 2009). In dieser Studie konnte sowohl in NHBE- als auch in A549-Zellen eine Expression von Raf-1 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Abbildung 12A). Deshalb wurde getestet, ob die Inhibition von Raf-1 zu einer Verminderung der IL-8-Antwort von A549-Dectin-1A gegen NTHi führt. Wie in Abbildung 12B gezeigt wird, hatte die Raf-1-Inhibition hier keinen Effekt auf die IL-8-Antwort der Zellen. Anscheinend ist also Raf-1 für die Dectin-1A-abhängige IL-8-Sekretion in den A549-Zellen essentiell.

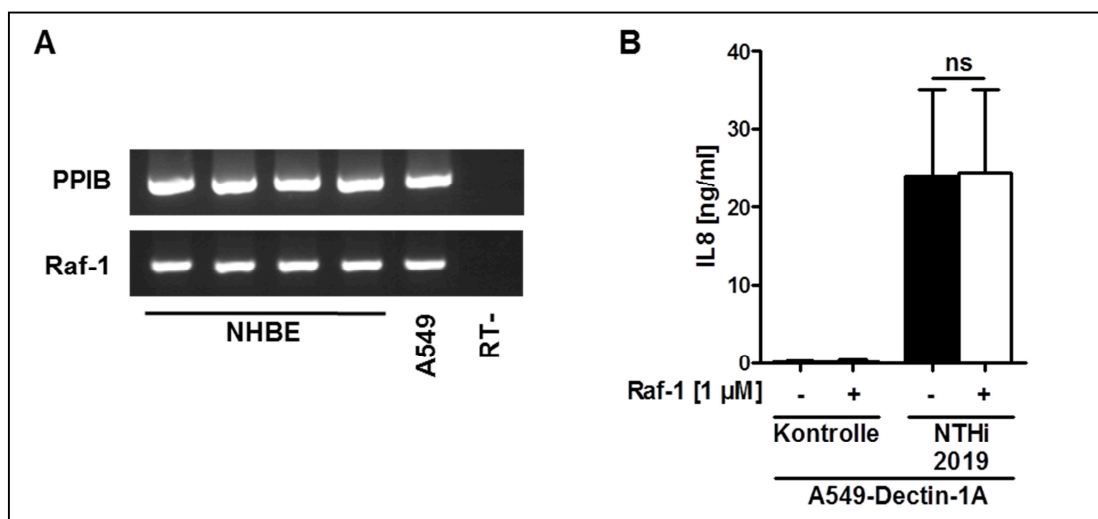


Abbildung 12: Die Bedeutung von Raf-1 für die NTHi-induzierte, Dectin-1-abhängige IL-8 Sekretion. (A) Nachweis der mRNA-Expression von Raf-1 in NHBE- und A549-Zellen (PPIB: 28 Zyklen, Raf-1: 34 Zyklen), semiquantitative PCR; (B) Die NTHi-induzierte IL-8-Sekretion von A549-Dectin-1A nach Raf-1-Inhibition (ELISA). Das Diagramm zeigt den Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. ns-nicht signifikant.

7.3.5 Die Bedeutung einer Dectin-1-TLR2-Interaktion für die NTHi-induzierte Immunantwort in pulmonalen Epithelzellen

Wie in verschiedenen Publikationen gezeigt werden konnte, kann TLR2 als Co-Rezeptor von Dectin-1 fungieren (Dennehy et al. 2008, Dennehy et al. 2009, Gantner et al. 2003). Deshalb sollte auch in dieser Arbeit eine Beteiligung von TLR2 an der Dectin-1-abhängigen Zytokinantwort von pulmonalen Epithelzellen auf NTHi untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten NHBE-Zellen alle TLR2 sowie dessen Co-Rezeptoren TLR1 und TLR6 exprimieren (Abbildung 13A). Folglich könnte TLR2 in NHBE-Zellen als Co-Rezeptor mit Dectin-1 interagieren. Die verwendeten A549-Zellen dagegen exprimieren zwar TLR1 und TLR6, aber kein TLR2. Eine Verstärkung der IL-8-Antwort gegen NTHi durch eine Interaktion von TLR2 und Dectin-1A scheint bei A549-Zellen demnach nicht wahrscheinlich.

Um die Beteiligung von TLR2 an der Dectin-1-abhängigen Immunantwort gegen NTHi näher zu untersuchen, wurde das HEK293-NF- κ B-Reporter-Modell verwendet (Abbildung 13B). Dabei wurden die Zellen mit Dectin-1A, TLR2 oder einer Kombination aus beidem transfiziert und die Menge der NF- κ B-Aktivierung, nach Stimulation mit NTHi, dem TLR2-Liganden Pam₃Cys oder dem Dectin-1/TLR2-Liganden Zymosan, anhand der Luciferase-Aktivität gemessen. Als Negativkontrolle dienten NF- κ B-Reporterzellen, die mit einem Kontrollvektor statt mit Dectin-1A oder TLR2 transfiziert wurden. In den nur mit TLR2 transfizierten Zellen konnte nach Stimulation mit Pam₃Cys und Zymosan im Vergleich zu den Vektorkontrollzellen eine signifikante NF- κ B-Aktivierung nachgewiesen werden. Die Zellen scheinen also nach der Transfektion mit TLR2 zu einer TLR2-abhängigen Signalweiterleitung, die in einer NF- κ B-Aktivierung resultiert, in der Lage zu sein. Nach einer Stimulation der mit TLR2 transfizierten Zellen mit NTHi war hingegen keine Zunahme der NF- κ B-Aktivierung nachweisbar. Wie in Kapitel 7.3.3 bereits beschrieben, induzierte NTHi auch in den mit der Vektorkontrolle transfizierten Zellen eine eindeutige NF- κ B-Aktivierung. NTHi 2019 führte somit zu einer generellen Aktivierung der NF- κ B-Antwort, induzierte aber keine TLR2-abhängige NF- κ B-Aktivierung. Auch die Expression von Dectin-1 hatte keinen Einfluss auf die NF- κ B-Aktivierung durch NTHi 2019. Des Weiteren war Zymosan, das sowohl TLR2- als auch Dectin-1-Ligand ist, in den mit Dectin-1 transfizierten Zellen nicht in der Lage, eine NF- κ B-Aktivierung zu induzieren.

Möglicherweise fehlt in diesem Versuchsansatz ein noch nicht bekannter, essentieller Bestandteil für eine Dectin-1A-induzierte Signalkette. Außerdem reagierten die Zellen bei Co-Transfektion mit TLR2 und Dectin-1 signifikant schwächer auf Zymosan und Pam₃Cys als nach Transfektion mit ausschließlich TLR2. Hier scheint eine negative Regulation von TLR2 durch Dectin-1 stattzufinden.

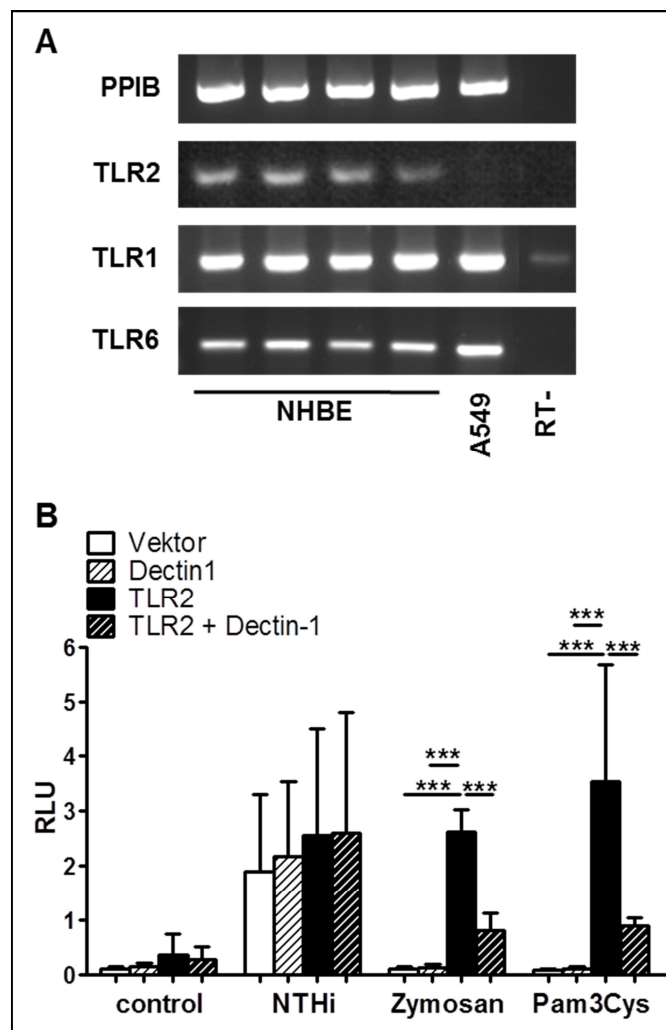


Abbildung 13: Die Dectin-1-TLR2-Interaktion. (A) Die Expression von TLR2 (35 Zyklen), TLR1(38 Zyklen) und TLR6 (35 Zyklen) auf RNA-Ebene in NHBE- und A549-Zellen; (B) NF-κB-Aktivierung in transient mit Dectin-1 und/oder TLR2 transfizierten HEK293-Zellen nach Stimulation mit NTHi (MOI 1), dem TLR2-Liganden Pam₃Cys (1 µg/ml) und dem Dectin-1/TLR2-Liganden Zymosan (100 µg/ml); Luciferase-Reporter-Assay; RLU „relative light units“; ***p<0,001

7.4 Untersuchung der Dectin-1-NTHi-Interaktion auf humanen pulmonalen Epithelzellen

Für die Charakterisierung der Adhäsion von NTHi an Dectin-1 wurde zunächst ein cfu-basierter Adhäsionsassay durchgeführt: Anhand der Zelllinien A549-Vektor, A549-Dectin-A und A549-Dectin-1B wurde untersucht, ob NTHi Dectin-1-abhängig an die Zellen bindet (Abbildung 14A). Dabei konnten keine Unterschiede in der Adhäsion der Bakterien an die Zellen festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass die Bindung von NTHi an Dectin-1 entweder nur transient oder mit geringer Affinität erfolgt, aber ausreichend für eine funktionelle Interaktion ist, oder, dass sie einen Co-Faktor benötigt.

Da gezeigt werden konnte, dass Galectin-3 während der Interaktion mit *C. albicans* ein Co-Rezeptor für Dectin-1A ist (Esteban et al. 2011), sollte weiter untersucht werden, ob Galectin-3 eine Bindung zwischen Dectin-1 und NTHi vermitteln kann. Wie Abbildung 14B zeigt, exprimieren sowohl NHBE- als auch A549-Zellen Galectin-3 mRNA. Um eine Bindung zwischen NTHi und Galectin-3 nachzuweisen wurde ein Pulldown durchgeführt. Dabei wurden die Bakterien mit rekombinantem Galectin-3 (rhGal3) co-inkubiert, die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert und das Pellet lysiert. Anschließend wurde anhand eines Western Blots nachgewiesen, ob das rekombinante Galectin-3 an NTHi gebunden hat und folglich im Bakterienlysat zu finden ist, oder ob es nicht gebunden hat und im Überstand verblieben ist. Wie in Abbildung 14C dargestellt, ist das rekombinante Galectin3 im Bakterienpellet zu finden und hat somit an NTHi gebunden. In Abbildung 14D konnte gezeigt werden, dass eine Vorinkubation von NTHi mit Galectin-3 im Adhäsionsassay bei A549-Dectin-1A-Zellen zu signifikant mehr gebundenen Bakterien führte. Im Gegensatz dazu war die Adhäsion von mit Galectin-3 co-inkubierten NTHi zwar tendenziell, aber nicht signifikant erhöht. Galectin-3 scheint also in Lage zu sein NTHi mit glykolysierten Strukturen auf der Zelloberfläche, wie Dectin-1A, zu vernetzen und somit die Adhäsion von NTHi an die Zellen zu verbessern.

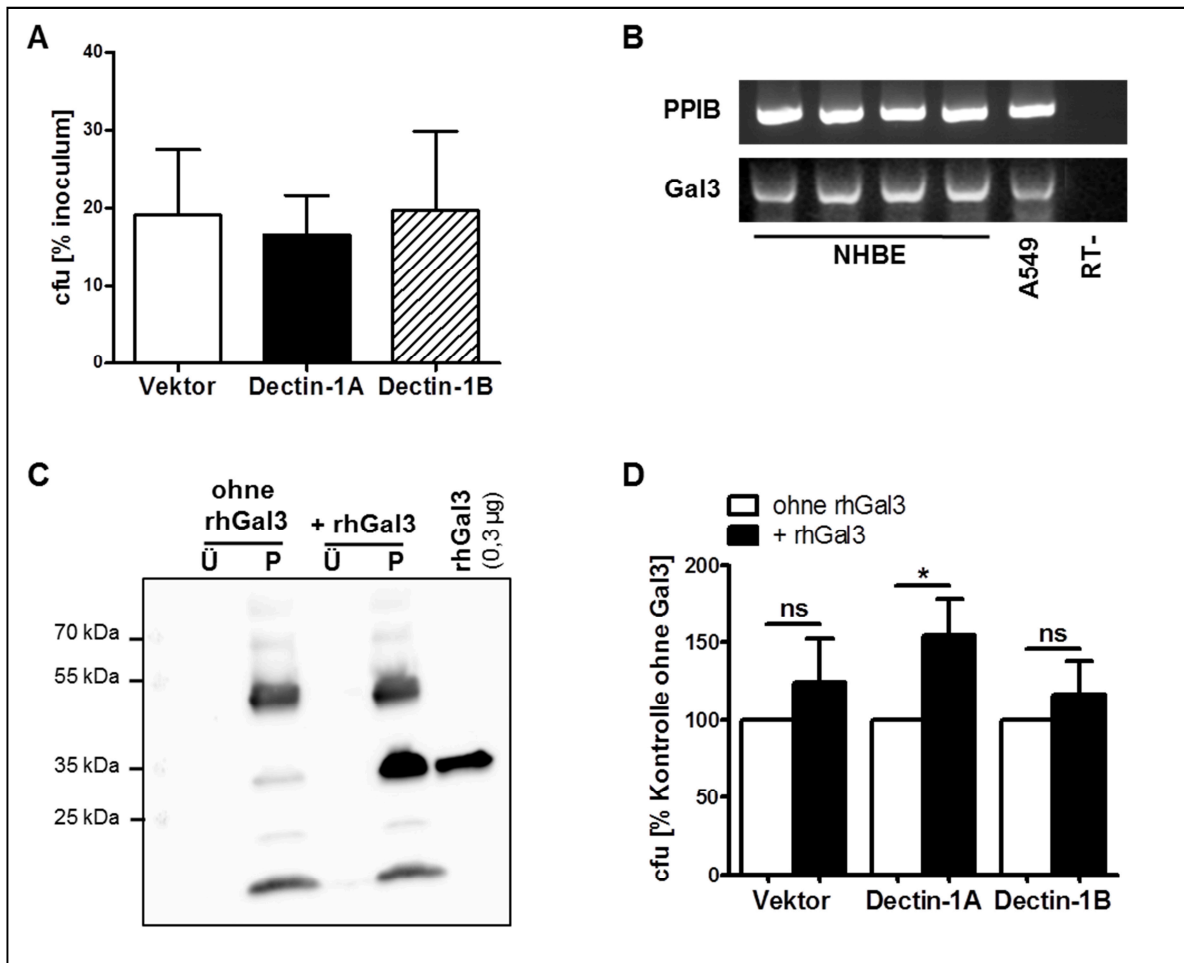


Abbildung 14: Untersuchung der NTHi-Dectin-1-Interaktion. (A) Cfu-basierter Adhäsionsassay von NTHi an A549-Vektor-, A549-Dectin-1A- und A549-Dectin-1B-Zellen; (B) Die Expression von Galectin-3 (Gal3) mRNA in NHBE- und A549-Zellen im Vergleich zu dem Haushaltsgen PPIB (PPIB: 28 Zyklen, Gal3: 34 Zyklen), semiquantitative PCR; (C) Nachweis der Bindung von rekombinantem humanem Galectin-3 (rhGal3) an NTHi (Pull-down), Ü Überstand, P NTHi-Pellet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten. (D) Cfu-basierter Adhäsionsassay von NTHi mit und ohne rhGal3 an A549-Vektor-Zellen, A549-Dectin-1A- und A549-Dectin-1B-Zellen. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. ns nicht signifikant; * $p < 0,05$.

8 Diskussion

8.1 Die Expression und Regulation von Dectin-1 auf humanem Lungenepithel

Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression von Dectin-1 in humanen Lungenepithelzelllinien (mit Papillomavirus immortalisierte Bronchialepithelzellen bzw. A549-Zellen) durch *A. fumigatus* und *M. tuberculosis* induziert werden kann (Lee et al. 2009a, Sun et al. 2012). Außerdem konnten Cunha et al. (Cunha et al. 2010) anhand von Patienten mit hämatopoetischer Stammzelltransplantation nachweisen, dass der Dectin-1-Stopp-Codon-Polymorphismus Y238X, der zu verringerter Rezeptoraktivität führt, verantwortlich ist für ein erhöhtes Risiko an invasiver Aspergillose zu erkranken. Dies ist unabhängig davon, ob der Spender oder der Empfänger der Stammzellen Träger des Polymorphismus ist, was darauf hindeutet, dass die Expression von Dectin-1 sowohl auf hämatopoetischen Zellen, als auch auf pulmonalen Epithelzellen eine wichtige Rolle für die Immunantwort gegen *A. fumigatus* einnimmt.

In dieser Arbeit konnten mittels immunhistochemischer Untersuchungen anhand von humanen Lungenbiopsien das erste Mal gezeigt werden, dass Dectin-1 im Lungengewebe, und hier besonders auf der apikalen Seite des Bronchial- und Alveolarepithels, exprimiert wird. Die apikale Expression ermöglicht es Pathogenen wie *A. fumigatus*, *M. tuberculosis* und NTHi direkt mit Dectin-1 zu interagieren. Obwohl eine Assoziation der Expression von Dectin-1 mit COPD oder dem Rauchen nicht nachgewiesen werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass die in COPD-Patienten und Rauchern zu beobachtende zunehmende Beeinträchtigung der mukoziliären Reinigung (Stampfli und Anderson 2009) den Interaktionen zwischen Pathogenen und dem epithelial exprimierten Dectin-1 Vorschub leisten. Dies könnte in COPD-Patienten oder Rauchern zu einer verstärkten pro-inflammatorischen Immunantwort gegen *A. fumigatus*, *M. tuberculosis* und NTHi führen und somit einen durch diese Pathogene ausgelösten entzündlichen Prozess unterhalten oder verstärken.

In den in dieser Studie erhaltenen Resultaten zeigte sich, dass die Intensität der Dectin-1-Färbung in den einzelnen Lungenschnitten zwischen den verschiedenen Patienten

variierte. Dies kann z.B. auf genetische Unterschiede und/oder auf eine spezifische Regulation zurückzuführen sein. In weiterführenden Untersuchungen wurde den Mechanismen der Dectin-1-Regulation auf pulmonalem Epithel weiter nachgegangen. Die dafür verwendeten primären humanen Bronchialepithelzellen gesunder Spender zeigten ebenfalls eine Variabilität in der Dectin-1-Expression. Die Dectin-1-Expression wurde insbesondere durch den TLR3-Liganden PolyI:C, die Typ I Interferone IFN α und IFN β und das Typ II Interferon IFN γ induziert. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit Melkamu et al., die nachwiesen, dass in immortalisierten NHBE-Zellen die Expression von Dectin-1 durch PolyI:C induzierbar ist (Melkamu et al. 2009). Matsumoto und Seya (Matsumoto und Seya 2008) demonstrierten, dass infolge einer TLR3 Aktivierung die Expression von Typ I Interferonen induziert werden kann. Diese Beobachtung konnte kürzlich in unserer Arbeitsgruppe in primären humanen Bronchialepithelzellen bestätigt werden (Klaile et al. 2013). Dies lässt vermuten, dass die Expression von Dectin-1 primär durch das durch PolyI:C induzierte IFN β reguliert wird. Im Gegensatz dazu wiesen Weck et al. nach einer Stimulation mit PolyI:C eine Verminderung der Dectin-1-Expression in Dendritischen Zellen nach (Weck et al. 2008). Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass die Regulation der Dectin-1-Expression in unterschiedlichen Zellen auf verschiedene Weise reguliert wird.

IFN γ kann, z. B. in Folge einer Infektion mit *M. tuberculosis* (Ottenhoff 2012), von aktivierten T-Zellen, Natürlichen Killerzellen und Makrophagen sekretiert werden (Saha et al. 2010). Typ I Interferone können hingegen von nahezu allen Arten von Zellen sekretiert werden und sind vor allem bei viralen Infektionen von großer Bedeutung (Gonzalez-Navajas et al. 2012). Zusätzlich können sie auch durch bakterielle Pathogene TLR-abhängig induziert werden (Parker und Prince 2011). Interferone werden also als Reaktion auf eine Vielzahl verschiedener viraler und bakterieller Infektionen sekretiert. Daher ist es möglich, dass eine vorrausgehende Infektion eine Interferon-abhängige Steigerung der Dectin-1-Expression auf pulmonalem Epithel induzieren und somit das Risiko einer verstärkten Inflamationsreaktion bei Infektionen mit durch Dectin-1 detektierten Erregern bewirken könnte.

Das C-reaktive Protein (CRP) gilt als Indikator einer Entzündungsreaktion. Die Intensität der in dieser Arbeit nachgewiesenen Dectin-1-Färbung in den Lungenschnitten korrelierte allerdings nicht mit dem Level an CRP im Blut der Patienten, obwohl eine leichte Tendenz zu beobachten war, dass mit zunehmendem CRP die Dectin-1-Expression im

Bronchialepithel vermehrt vorlag. Eine statistisch relevante Aussage, ob inflammatorische Prozesse mit der Dectin-1-Expression assoziiert sind, ist hier allerdings aufgrund der geringen Gruppengrößen schwierig.

Microbial-associated molecular patterns (MAMPs) bakteriellen Ursprunges zeigten *in vitro* an primären humanen Bronchialepithelzellen keine Assoziation mit der Dectin-1-Expression. Zudem konnte keine Abhängigkeit mit der Zellaktivierung durch TLR1/2, 2/6 und 5 nachgewiesen werden. Lee et al. (Lee et al. 2009a) und Sun et al. (Sun et al. 2012), zeigten allerdings, dass die Hochregulation der Dectin-1-Expression auf humanen Lungenepithelzelllinien (A549 bzw. immortalisierte NHBE-Zellen) durch *M. tuberculosis* bzw. *A. fumigatus* abhängig von TLR2 ist. Obwohl die hier verwendeten NHBE-Zellen sowohl TLR2 als auch dessen für die Erkennung von Malp-2 benötigten Co-Rezeptor TLR6 exprimierten (Abbildung 13), reagierten die Zellen nur mit einer sehr schwachen IL-8-Antwort auf die Stimulation mit Malp-2 (Abbildung 5). Auf eine Stimulation mit dem TLR1/2-Agonisten Pam₃Cys reagierten die Zellen des für diese Experimente verwendeten Spenders, trotz TLR1- und TLR2-Expression gar nicht (Abbildung 5). Dies lässt vermuten, dass der Spender dieser Zellen aufgrund einer genetischen Veranlagung nicht zu einer effizienten, TLR2-induzierten Immunantwort in der Lage war, bzw. bisher unbekannte Co-Faktoren zur Steigerung der TLR2 Antwort in unserem experimentellen Ansatz auf den Zellen nicht vorhanden waren.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, welche Dectin-1-Isoformen in den NHBE-Zellen exprimiert und induziert werden. Es wurden alle Isoformen bzw. *Splicing*-Varianten gleichermaßen reguliert. Dabei wurden die Isoformen Dectin-1A, Dectin-1B und Dectin-1D sowie eine neue, in dieser Arbeit erstmals beschriebene Isoform, die hier als „NEU“ bezeichnet wird, nachgewiesen (siehe Abbildung 15).

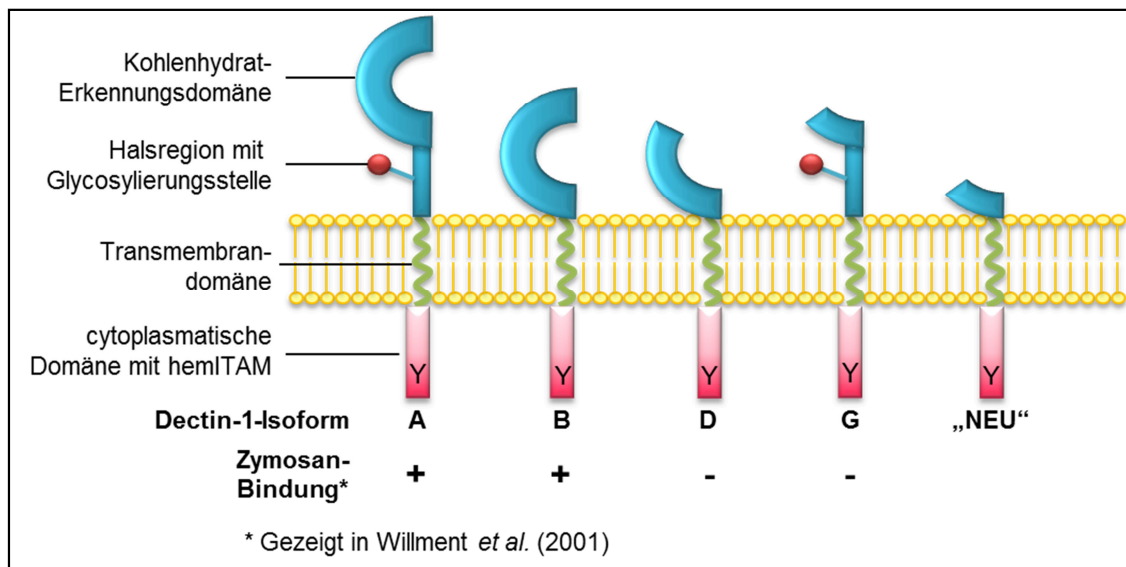


Abbildung 15: In dieser Studie in NHBE-Zellen nachgewiesene Dectin-1-Isoformen und ihre in Wilment et al. (2001) untersuchte Fähigkeit Zymosan zu binden In NHBE-Zellen wurden die Dectin-1-Isoformen A, B, D und „NEU“ identifiziert. Isoform Dectin-1A und Dectin-1B sind die einzigen Varianten mit vollständiger Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne. Dectin-1NEU ähnelt Isoform Dectin-1G, enthält allerdings nicht die Halsregion mit der Glykolyseierungsstelle.

Die Ergebnisse zeigten weiter, dass die nichtglykosylierte Isoform Dectin-1B auf pulmonalem Epithel am stärksten exprimiert wird. In vorangegangenen Studien konnte diese auch auf Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen als die am häufigsten exprimierte Isoform identifiziert werden (Willment et al. 2005). Isoform Dectin-1A, die einzige der hier identifizierten Isoformen mit einer Glykolyseierungsstelle, und Isoform Dectin-1D wurden hier in NHBE-Zellen weniger stark exprimiert als Isoform Dectin-1B. Letztere weist eine verkürzte Erkennungsdomäne auf, die nicht mehr in der Lage ist Zymosan zu binden (Willment et al. 2001). Außerdem konnten in den hier durchgeführten Untersuchungen zwei weitere *Splicing*-Varianten identifiziert werden, die beide für das gleiche Protein („NEU“) codieren. Dieses ähnelt der Isoform Dectin-1G, enthält allerdings im Gegensatz zu dieser nicht die Halsregion und somit auch keine Glykolyseierungsstelle. Die Erkennungsdomäne von Isoform Dectin-1G ist ebenfalls verkürzt und ist wie in der Studie von Wilment et al., in welcher die funktionellen Charakteristika der einzelnen Dectin-1-*Splicing*-Varianten beschrieben werden, nicht in der Lage Zymosan zu binden (Willment et al. 2001). Daher scheint es wahrscheinlich, dass auch die neu identifizierte Isoform zu einer Bindung mit Zymosan nicht in der Lage ist. Dieser Fragestellung muss aber zur sicheren Klärung noch im Rahmen eines experimentellen Ansatzes nachgegangen

werden. Die Funktion der verschiedenen Isoformen für die Pathogenese von Erkrankungen mit Dectin-1-bindenden Erregern ist bislang noch unklar. Es wird vermutet, dass für eine effektive Signaltransduktion über das Rekrutieren der Syk-Kinase Dectin-1 wegen seines unvollständigen als hemITAMs bezeichneten intrazellulären Signalmotives mit nur einem anstatt der zwei benötigten Tyrosine für eine Signalweiterleitung Dimere ausbildet (Rogers et al. 2005). Daher wäre es möglich, dass sich solche Dimere auch aus verschiedenen Dectin-1-Isoformen zusammensetzen, von denen möglicherweise nur eine Isoform eine funktionale Erkennungsdomäne besitzen muss, so dass Isoformen ohne funktionale Erkennungsdomäne ebenfalls eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion spielen könnten. Dies bedarf allerdings weiterführender Experimente.

8.2 Die Bedeutung von Dectin-1 für die pro-inflammatorische Immunantwort gegen NTHi

Das Fortschreiten und die Schwere einer COPD-Erkrankung werden durch eine bakteriell induzierte Inflammation negativ beeinflusst. Dabei sind Infektionen mit NTHi die häufigste Ursache für akute bakteriell bedingte Exazerbationen bei COPD-Patienten (Moghaddam et al. 2011). Auf dem Boden der Vorarbeiten von Áhren et al, die in ihren Versuchen zu der Annahme kamen, NTHi könne ein Ligand für Dectin-1 sein (Ahren et al. 2001b, Ahren et al. 2003), wurden in dieser Arbeit weiterführende Untersuchungen zu der Interaktion zwischen diesem Erreger und primärem Bronchialepithel durchgeführt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Infektionen von primären humanen Bronchialepithelzellen (NHBE) mit NTHi die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-8 und IL-6 in Abhängigkeit von der Dectin-1-Expression signifikant verstärkten.

In einem Überexpressionsmodell der Zelllinie A549 wurden diese Ergebnisse bestätigt und es konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass die Expression von Dectin-1A, in Abhängigkeit von einer funktionalen hemITAM-Domäne, zu einer signifikanten Steigerung der durch NTHi induzierten IL-8 Sekretion führte. Auch in vorangegangenen Publikationen konnte gezeigt werden, dass die hemITAM-Domäne essentiell für die Signalweiterleitung nach einer Ligandenbindung von Dectin-1 ist (Brown et al. 2003, Herre et al. 2004, Rogers et al. 2005). Diese Ergebnisse bestätigen die initial von Áhren et al. aufgeführte Hypothese und zeigen, dass NTHi die pro-inflammatorische Immunantwort von humanen

Lungenepithelzellen über eine Pathogenerkennung via Dectin-1 verstärkt. Damit ist wahrscheinlich, dass Dectin-1 einen Muster-Erkennungs-Rezeptor (PRR) für NTHi darstellt.

Interessanterweise spielte im A549-Modell die nicht-glykosylierte Isoform Dectin-1B im Gegensatz zur glykosylierten Isoform Dectin-1A keine Rolle für die IL-8-Antwort gegen NTHi. Dies ist möglicherweise ein Hinweis auf einen für die Dectin-1-NTHi-Interaktion essentiellen Co-Faktor, dessen Funktion abhängig von der Glycosylierungsstelle von Dectin-1 ist (siehe auch Kapitel 8.3).

Anhand des A549-Überexpressionsmodells wurde im Weiteren untersucht, ob die NTHi-induzierte Aktivierung von NF- κ B durch Dectin-1 gesteigert wird. Durch Dectin-1 können verschiedene Signalwege ausgelöst werden (Geijtenbeek und Gringhuis 2009). Die meisten dieser Wege haben eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und dessen Untereinheit p65 gemeinsam (siehe Abbildung 2, S.20). Deshalb wurde in dieser Studie zunächst die Dectin-1-abhängige Translokation von p65 an den Promotor des IL-8 Gens mittels ChIP untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass in Zellen, die Dectin-1A exprimierten und im ELISA nach Stimulation mit NTHi eine gesteigerte IL8-Sekretion zeigten, mehr p65 an den IL-8 Promotor gebunden war als in Zellen ohne Dectin-1. NF- κ B ist folglich auch in Lungenepithelzellen ein wichtiges Schlüsselmolekül für die Dectin-1-abhängige Signaltransduktion.

Bei der NF- κ B-Aktivierung über den sogenannten kanonischen (klassischen) Signalweg, kommt es in Abhängigkeit der Syk-Kinase und des Card9/Bcl10/Malt1-Komplexes zur Aktivierung und nukleären Translokation der NF- κ B-Untereinheiten p65 und REL. Alternativ kann, ebenfalls abhängig von Syk, über den sogenannten nicht-kanonischen Signalweg unabhängig von Card9, Bcl10 und Malt1, eine Aktivierung der NF- κ B-Untereinheit RelB erfolgen. Die getesteten NHBE-Chargen wiesen alle eine Expression von Syk, Card9, Bcl10 und Malt1 auf. Somit ist es prinzipiell möglich, dass die NTHi getriggerte Dectin-1-abhängige Signaltransduktion in Bronchialepithelzellen über die Aktivierung des Card9/Bcl10/Malt1-Komplexes verläuft. Die durch NTHi induzierte IL-8-Antwort der NHBE-Zellen war vollständig abhängig von einer Syk- bzw. Src-Kinase-Aktivität, wie es auch für die Dectin-1-abhängige Signaltransduktion bekannt ist.

In den hier beschriebenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in den verwendeten A549-Zellen mittels PCR weder eine Expression von Syk noch von Card9 oder Bcl10 nachweisbar war. Auch eine entsprechende transiente Transfektion der A549-Dectin-1A- und A549-Dectin1B-Zellen mit diesen wichtigen Komponenten der Dectin-1-abhängigen Signaltransduktion führte zu keiner signifikanten Verstärkung der NTHi induzierten IL-8-Antwort. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass weder Syk noch das Card9-Signalosom für die Dectin-1A-abhängige Antwort gegen NTHi essentiell sind. Auch im HEK-Zell-Modell konnte nicht nachgewiesen werden, dass eine Aktivierung von Dectin-1A durch Stimulation mit NTHi zu einer Card9/Bcl10-abhängigen NF- κ B-Aktivierung führt. Im Gegensatz zu Gross et al. (Gross et al. 2006) induzierte auch Zymosan keine Dectin-1 und Card9/Bcl10-abhängige Aktivierung. Dies lässt vermuten, dass den hier verwendeten HEK293-Zellen möglicherweise ein weiterer essentieller Bestandteil der Signalkaskade oder ein Co-Rezeptor fehlt. Daher kann anhand dieser Ergebnisse keine Aussage über die Bedeutung des CARD9/Bcl10/Malt1-Signalosoms für die NTHi vermittelte Dectin-1-abhängige Zellaktivierung getroffen werden. Es lässt sich jedoch vermuten, dass die Bedeutung eher marginaler Natur ist. Darüber hinaus erscheint es durchaus möglich, dass die Dectin-1-abhängige NF- κ B-Aktivierung in Epithelzellen über andere Signalwege vermittelt wird, so wie dies für Dendritische Zellen bereits beschrieben ist. So haben Gringhuis et al. erstmals einen Dectin-1-induzierten Signalweg nachgewiesen, der in Abhängigkeit der Raf-1-Kinase die Aktivität von NF- κ B kontrolliert (Gringhuis et al. 2009). Es konnte sowohl für NHBE- als auch für A549-Zellen die Expression von Raf-1 nachgewiesen werden. Die Inhibition von Raf-1 hatte jedoch keinen Einfluss auf die durch NTHi in A549-Dectin-1A Zellen induzierte Immunantwort, so dass eine bedeutende Rolle von Raf-1 in diesem Modell unwahrscheinlich ist.

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Dectin-1 mit verschiedenen MyD88-abhängigen *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) kollaboriert (Dennehy et al. 2008, Dennehy et al. 2009, Ferwerda et al. 2008, Gantner et al. 2003, Huang et al. 2009). Insbesondere die Interaktion mit TLR2 wurde dabei mehrfach untersucht. Während NHBE-Zellen TLR2 exprimieren und daher eine Kollaboration möglich wäre, konnte in den A549-Zellen keine TLR2-Expression nachgewiesen werden. Folglich ist die Verstärkung der NTHi-induzierten IL-8-Antwort durch Dectin-1A in den A549-Zellen nicht von einer Interaktion mit TLR2 abhängig. Folgt man den Publikationen zu diesem Thema ist es durchaus denkbar, dass

andere TLRs als mögliche Kandidaten für eine Kollaboration mit Dectin-1 in Frage kommen. So konnten Ferwerda et al. auf humanen Monozyten und Makrophagen eine Interaktion von Dectin-1 mit TLR2 und TLR4 nachweisen (Ferwerda et al. 2008). Huang et al. haben darüber hinaus eine Kollaboration mit TLR2, TLR4 und TLR9 auf humanen Dendritischen Zellen beschrieben (Huang et al. 2009). Es ist bekannt, dass die pro-inflammatorische Immunantwort gegen NTHi abhängig von TLR4 ist (Ahren et al. 2001a, Wieland et al. 2005). Ob eine Erkennung von NTHi-DNA durch TLR9 von Bedeutung ist, ist noch umstritten. So konnten Wieland et al. im Mausmodell keinen Einfluss auf die Immunantwort gegen NTHi feststellen (Wieland et al. 2010), während in der Studie von Leichtle et al. eine TLR9-Defizienz die Immunantwort von Mäusen gegen NTHi verzögerte und die Regeneration nach einer Otitis media-Erkrankung beeinträchtigte (Leichtle et al. 2012).

Um eine mögliche Kooperation zwischen Dectin-1 und TLR2 näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Studie HEK293-Zellen mit Dectin-1 und TLR2 transient transfiziert. Obwohl in vorangegangenen Publikationen gezeigt wurde, dass TLR2 die pro-inflammatorische Immunantwort gegen NTHi verstärkt (Chen et al. 2004, Lugade et al. 2011, Shuto et al. 2001), konnte hier keine TLR2-abhängige NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit NTHi festgestellt werden, obwohl anhand der Stimulation mit Pam₃Cys und Zymosan nachgewiesen wurde, dass die mit TLR2 transfizierten Zellen durchaus in der Lage waren eine TLR2-abhängige Signalkaskade zu induzieren. Da bereits in den Zellen ohne TLR2 oder Dectin-1 eine deutliche, von der Erkennung durch diese PRRs unabhängige, NF- κ B-Aktivierung durch NTHi induziert wurde, wird NTHi auf HEK293-Zellen vermutlich durch alternative, dominant wirkende Rezeptoren erkannt. Eine Co-Expression von TLR2 und Dectin-1 auf den HEK293-Zellen hatte keinen Einfluss auf die Antwort gegen NTHi und verminderte sogar die Zymosan induzierte NF- κ B-Aktivierung und die des TLR2-Liganden Pam₃Cys. Im Gegensatz dazu zeigten Gantner et al. in Co-Transfektionsexperimenten in HEK293-Zellen, dass die Expression von TLR2 und Dectin-1 die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit Zymosan synergistisch verstärkt (Gantner et al. 2003). Eine zuverlässige Aussage über die funktionelle Zusammenarbeit von Dectin-1 und TLR2 während NTHi-Infektionen konnte aufgrund der hier im HEK-Modell gewonnenen Ergebnisse somit nicht getroffen werden.

Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass Epithelzellen möglicherweise andere Signalwege und Co-Rezeptoren für ihre Dectin-1-abhängige Aktivierung nutzen als die in den vorangegangenen Studien verwendeten hämatopoetischen Zellen. Darüber hinaus wurden in den erwähnten Studien stets β -1,3-Glucane oder Pilze als Dectin-1-Liganden verwendet. Welches NTHi-Produkt Dectin-1 aktiviert und inwiefern sich diese Interaktion analog zu der Interaktion von Dectin-1 mit β -1,3-Glucanen verhält, konnte noch nicht geklärt werden.

8.3 Die Interaktion von NTHi und Dectin-1

Beta-1,3-Glucan aus der Zellwand verschiedener Pilze ist der am meisten publizierte Ligand von Dectin-1 (Drummond und Brown 2011, Brown und Gordon 2003, Gantner et al. 2005, Steele et al. 2003, Steele et al. 2005, Viriyakosol et al. 2005, Adams et al. 2008, Brown et al. 2003, Taylor et al. 2007). Welcher NTHi-spezifische Ligand aber für die funktionale Beziehung zwischen Dectin-1 und NTHi verantwortlich ist, ist bislang ungeklärt. Hierzu sind weiterführende Untersuchungen geplant. Um zu überprüfen, ob NTHi über Dectin-1 an Lungenepithelzellen binden kann, wurde ein cfu-basierter Adhäsionsassay anhand stabil transfizierter A549-Zellen durchgeführt, die entweder gar kein Dectin-1 oder die Isoformen Dectin-1A bzw. Dectin-1B exprimierten. Die Stärke der Adhäsion der NTHi an die verschiedenen Zelllinien zeigte keine Unterschiede. Dectin-1 spielt demnach keine Rolle für die Adhäsion von NTHi an diese Zellen. Dies schließt jedoch eine funktionelle Interaktion NTHi-spezifischer Liganden mit Dectin-1 nicht aus und lässt vermuten, dass Dectin-1 eher für die Erkennung von NTHi und die nachfolgende Verstärkung der Inflammation als für die Verstärkung der Erregerkolonisierung von Bedeutung ist. So bindet auch der gut charakterisierte PRR TLR4, der eine wichtige Rolle in der Erkennung Gram-negativer Bakterien spielt, keine ganzen Bakterien, sondern nur den bakteriellen Bestandteil LPS, nachdem dieses zuvor durch den Co-Rezeptor MD-2 gebunden wurde (Maeshima und Fernandez 2013). Ob eine direkte oder durch Co-Rezeptoren vermittelte Interaktion von NTHi-Bestandteilen und Dectin-1 auftritt, soll in Zukunft mit Hilfe von rekombinantem Dectin-1A und NTHi bzw. NTHi-Fragmenten, anhand von Pulldown-Experimenten und Oberflächenplasmonresonanz (Biacore, GE Healthcare) untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Interaktion von NTHi mit Dectin-1 nicht über eine direkte Bindung, sondern durch Bindung an einen Co-Rezeptor vermittelt wird. Galectin-3, ein Lectin der Galectin Familie, bindet β -Galactoside und wurde von Esteban et al. (Esteban et al. 2011) mittels Co-Immunpräzipitation und funktionaler Assays als Co-Rezeptor von Dectin-1 bei der Erkennung von Zymosan und *C. albicans* identifiziert. Es wird in einer Vielzahl von Zelltypen und Geweben exprimiert (Dumic et al. 2006). Auch in NHBE- und A549-Zellen konnte hier eine Expression von Galectin-3-mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 14B). Galectin-3 spielt während akuter Inflammation eine Rolle in der Chemoattraktion und Aktivierung von Immunzellen und kann direkt mit Pathogenen interagieren (Dumic et al. 2006, Henderson und Sethi 2009, Vasta et al. 2012). So bindet es z.B. an β -1,2-Mannoside von *C. albicans*, was zum einen eine verstärkte Zytokin-Freisetzung durch Makrophagen bewirkt, zum anderen einen zytotoxischen Effekt auf *C. albicans* ausübt (Fradin et al. 2000, Jouault et al. 2006, Kohatsu et al. 2006). Auch bei Infektionen mit *S. pneumoniae* spielt Galectin-3 eine Rolle (Henderson und Sethi 2009). Es induziert u.a. die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und verstärkt deren Phagozytoseaktivität gegenüber *S. pneumoniae*. Außerdem übt es einen bakteriostatischen Effekt auf die Bakterien aus, wobei der Mechanismus unbekannt ist (Farnworth et al. 2008). Galectin-3 ist des Weiteren in der Lage Lipopolysaccharide von der äußeren Membran verschiedener Gram-negativer Bakterien zu erkennen (Fermino et al. 2011, Fowler et al. 2006, Gupta et al. 1997, John et al. 2002, Mey et al. 1996, Quattroni et al. 2012). Ob auch NTHi auf diese Weise durch Galectin-3 gebunden werden kann, ist bisher noch nicht untersucht worden. Mit Hilfe eines Pulldowns von rekombinantem Galectin-3 mit ganzen Bakterien konnte in dieser Arbeit erstmals eine direkte Interaktion von NTHi und Galectin-3 nachgewiesen werden. Aufgrund der gut dokumentierten Fähigkeit von Galectin-3 LPS zu binden erscheint es als wahrscheinlich, dass die Lipooligosaccharide von NTHi diese Bindung vermitteln. Welcher Ligand tatsächlich für die Bindung von NTHi und Galectin-3 verantwortlich ist, muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

Von Esteban et al. (Esteban et al. 2011) wurde gezeigt, dass Galectin-3 an Dectin-1 bindet und die TNF α Sekretion von Mausmakrophagen nach Stimulation mit *C. albicans*, die von Galectin-3 gebunden werden (Fradin et al. 2000) synergistisch zu verstärken vermag. Daher wurde, nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Galectin-3 NTHi bindet, in weiteren Experimenten analysiert, ob Galectin-3 eine Interaktion zwischen NTHi und

Dectin-1 vermitteln kann. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Bindung von NTHi mit Galectin-3 die Adhäsion von NTHi an die Zelloberfläche verstärkt und zwar tendenziell mehr, wenn die Zellen Dectin-1A überexprimieren. Folglich scheint Galectin-3 NTHi mit glycosylierten Strukturen wie Dectin-1A, auf der Wirtszelloberfläche quervernetzen zu können.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Galectin-3 eine Bindung von NTHi an Dectin-1A vermitteln kann. Da Galectin-3 ein zuckerbindendes Protein ist, kann es theoretisch nur die glycosylierte Isoform Dectin-1A binden. Eine Galectin-3 vermittelte Interaktion zwischen NTHi und Dectin-1 ist folglich nur mit Dectin-1A möglich. Interessanterweise führte, in Übereinstimmung damit, im A549-Modell ausschließlich die Expression von Dectin-1A zu einer Verstärkung der IL-8-Antwort gegen NTHi, während die Expression der nicht-glycosylierten Isoform B keinen Effekt hatte. Galectin-3 könnte daher auch funktional ein wichtiger Co-Rezeptor für die Interaktion von NTHi und Dectin-1 sein. Hierzu sind weitere Untersuchungen geplant.

9 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Dectin-1 in humanem Lungengewebe auf der apikalen Seite des Lungenepithels exprimiert wird. Diese besondere Lokalisation lässt den Schluss zu, dass respiratorische, Dectin-1-bindende Pathogene wie *A. fumigatus*, *M. tuberculosis* und wie hier gezeigt auch NTHi auf dem Epithel mit Dectin-1 interagieren können. Normalerweise schützt die mukoziliäre Reinigung das Epithel vor einer Kolonisierung durch Pathogene. Ist diese durch das Rauchen oder eine COPD jedoch nicht mehr effizient, können pathogene Erreger direkt mit den Epithelzellen interagieren. Die Expression von Dectin-1 in der Lunge konnte in dieser Arbeit nicht mit einer Erkrankung an COPD oder dem Rauchen von Tabak assoziiert werden. Auch die Konzentration an C-reaktivem Protein, einem Marker für Inflammation, zeigte allenfalls eine leichte Tendenz bezüglich einer Assoziation mit einer vermehrten Dectin-1-Expression. Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass die Dectin-1-Expression in primären Bronchialepithelzellen durch Interferone induziert wird. Vor allem während viraler Infektionen werden Typ I Interferone sekretiert. Die Expression von Dectin-1 auf humanem Lungenepithel könnte also durch virale Infektionen induziert oder verstärkt werden und mit verstärkten Exazerbationen mit NTHi-Infektionen bei diesen Patienten einhergehen. Dies müsste in weiteren klinischen Studien überprüft werden.

Eine Infektion oder Kolonisierung des unteren Respirationstraktes durch NTHi kann entzündliche Reaktionen auslösen, die mit einer Gewebeschädigung und mit einem Fortschreiten der Schwere der COPD assoziiert sind. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist Dectin-1 in der Lage die durch NTHi in Bronchialepithelzellen induzierte pro-inflammatorische Immunantwort zu verstärken. Die Erkennung von NTHi durch epithelial exprimiertes Dectin-1 als PRR könnte daher in der Pathogenese der COPD von besonderer Bedeutung sein. Weiterführende Untersuchungen sind daher notwendig, um diese Interaktion zwischen NTHi und Dectin-1 in der humanen Lunge besser zu verstehen.

Die Phosphorylierung der hemITAM-Domäne und die Aktivierung von NF- κ B spielt in den durch Dectin-1 induzierten Signalkaskaden für die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine eine zentrale Rolle. Dies konnte in dieser Studie auch für Lungenepithelzellen bestätigt werden. Überraschenderweise waren in den hier durchgeführten Experimenten

weder Syk und Card9 noch Raf-1 oder TLR2 essentiell für die durch Dectin-1 induzierte Zytokinexpression infolge einer Stimulation mit NTHi. Es sind hierzu also weitere Untersuchungen notwendig, insbesondere hinsichtlich der Kollaboration von Dectin-1 mit anderen Pathogenerkennungs-Rezeptoren.

Obwohl in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Dectin-1 die durch NTHi induzierte Zytokinantwort in pulmonalen Epithelzellen verstärkt, ist der Mechanismus dieser Wechselwirkung noch unbekannt. Wie in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, bindet NTHi nicht in Abhängigkeit von Dectin-1 an die Epithelzellen, eine solche Adhäsion kann aber mit Hilfe von extrazellulärem Galectin-3, das NTHi vermutlich mit Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche vernetzen kann, vermittelt werden. Galectin-3 könnte also ein potentiell wichtiger Co-Rezeptor für die Interaktion von Dectin-1 und NTHi sein. Pilette et al. konnten beobachten, dass die Expression von Galectin-3 in den kleinen Atemwegen von COPD-Patienten erhöht war (Pilette et al. 2007). Folglich ist es möglich, dass extrazelluläres Galectin-3 während COPD-Exazerbationen für die Vermittlung einer NTHi-Dectin-1-Interaktion verfügbar ist. Inwiefern die Expression und Freisetzung von Galectin-3 durch NTHi selbst induziert werden kann und ob Galectin-3 über die Adhäsion von NTHi hinaus auch für die funktionelle Wechselwirkung von Dectin-1 und NTHi von Bedeutung ist, ist eine interessante Fragestellung für zukünftige Projekte und war auch Teil weiterer Arbeiten in unserem Labor.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass Dectin-1 in humanem Lungengewebe und insbesondere im pulmonalen Epithel exprimiert wird. Darüber hinaus konnte NTHi als neuer Ligand identifiziert werden, der durch Dectin-1 erkannt wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass diese erstmalig beschriebene Interaktion in der Pathogenese der COPD von besonderer Bedeutung ist.

10 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adams EL, Rice PJ, Graves B, Ensley HE, Yu H, Brown GD, Gordon S, Monteiro MA, Papp-Szabo E, Lowman DW, Power TD, Wempe MF, Williams DL. 2008. Differential high-affinity interaction of dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching. *J Pharmacol Exp Ther*, 325 (1):115-123.
- Ahmad N, Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R, Liu B, Macaluso F, Brewer CF. 2004. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem*, 279 (12):10841-10847.
- Ahren IL, Bjartell A, Egesten A, Riesbeck K. 2001a. Lipopolysaccharide-binding protein increases toll-like receptor 4-dependent activation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis*, 184 (7):926-930.
- Ahren IL, Williams DL, Rice PJ, Forsgren A, Riesbeck K. 2001b. The importance of a beta-glucan receptor in the nonopsonic entry of nontypeable *Haemophilus influenzae* into human monocytic and epithelial cells. *J Infect Dis*, 184 (2):150-158.
- Ahren IL, Eriksson E, Egesten A, Riesbeck K. 2003. Nontypeable *Haemophilus influenzae* activates human eosinophils through beta-glucan receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29 (5):598-605.
- Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, Xu S, Ritter R, 3rd, Kumamoto T, Edelbaum D, Morita A, Bergstresser PR, Takashima A. 2000. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem*, 275 (26):20157-20167.
- Baggiolini M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392 (6676):565-568.
- Bals R, Hiemstra PS. 2004. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*, 23 (2):327-333.
- Bandi V, Apicella MA, Mason E, Murphy TF, Siddiqi A, Atmar RL, Greenberg SB. 2001. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the lower respiratory tract of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 164 (11):2114-2119.
- Barboni E, Coade S, Fiori A. 2005. The binding of mycolic acids to galectin-3: a novel interaction between a host soluble lectin and trafficking mycobacterial lipids? *FEBS Lett*, 579 (30):6749-6755.
- Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. 2003. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*, 22 (4):672-688.
- Berenson CS, Garlipp MA, Grove LJ, Maloney J, Sethi S. 2006. Impaired phagocytosis of nontypeable *Haemophilus influenzae* by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis*, 194 (10):1375-1384.
- Bookwalter JE, Jurcisek JA, Gray-Owen SD, Fernandez S, McGillivray G, Bakaletz LO. 2008. A carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 homologue plays a pivotal role in nontypeable *Haemophilus influenzae* colonization of the

- chinchilla nasopharynx via the outer membrane protein P5-homologous adhesin. *Infect Immun*, 76 (1):48-55.
- Brown GD, Gordon S. 2003. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*, 19 (3):311-315.
- Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*, 197 (9):1119-1124.
- Brown GD. 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, 6 (1):33-43.
- Brown J, O'Callaghan CA, Marshall AS, Gilbert RJ, Siebold C, Gordon S, Brown GD, Jones EY. 2007. Structure of the fungal beta-glucan-binding immune receptor dectin-1: implications for function. *Protein Sci*, 16 (6):1042-1052.
- Campagnari AA, Gupta MR, Dudas KC, Murphy TF, Apicella MA. 1987. Antigenic diversity of lipooligosaccharides of nontypable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 55 (4):882-887.
- Chen R, Lim JH, Jono H, Gu XX, Kim YS, Basbaum CB, Murphy TF, Li JD. 2004. Nontypeable *Haemophilus influenzae* lipoprotein P6 induces MUC5AC mucin transcription via TLR2-TAK1-dependent p38 MAPK-AP1 and IKKbeta-IkappaBalpha-NF-kappaB signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 324 (3):1087-1094.
- Chin CL, Manzel LJ, Lehman EE, Humlicek AL, Shi L, Starner TD, Denning GM, Murphy TF, Sethi S, Look DC. 2005. *Haemophilus influenzae* from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers. *Am J Respir Crit Care Med*, 172 (1):85-91.
- Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, Giovannini G, Zagarella S, Zelante T, D'Angelo C, Pierini A, Pitzurra L, Falzetti F, Carotti A, Perruccio K, Latge JP, Rodrigues F, Velardi A, Aversa F, Romani L, Carvalho A. 2010. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood*, 116 (24):5394-5402.
- Decramer M, Janssens W, Miravittles M. 2012. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 379 (9823):1341-1351.
- Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, Testelmans D, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG. 2007. Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 175 (10):998-1005.
- Dennehy KM, Ferwerda G, Faro-Trindade I, Pyz E, Willment JA, Taylor PR, Kerrigan A, Tsoni SV, Gordon S, Meyer-Wentrup F, Adema GJ, Kullberg BJ, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mora-Montes HM, Gow NA, Williams DL, Netea MG, Brown GD. 2008. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur J Immunol*, 38 (2):500-506.
- Dennehy KM, Willment JA, Williams DL, Brown GD. 2009. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways. *Eur J Immunol*, 39 (5):1379-1386.

- Drummond RA, Brown GD. 2011. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. *Curr Opin Microbiol*, 14 (4):392-399.
- Duim B, van Alphen L, Eijk P, Jansen HM, Dankert J. 1994. Antigenic drift of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* major outer membrane protein P2 in patients with chronic bronchitis is caused by point mutations. *Mol Microbiol*, 11 (6):1181-1189.
- Duim B, Vogel L, Puijk W, Jansen HM, Meloen RH, Dankert J, van Alphen L. 1996. Fine mapping of outer membrane protein P2 antigenic sites which vary during persistent infection by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 64 (11):4673-4679.
- Dumic J, Dabelic S, Flogel M. 2006. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*, 1760 (4):616-635.
- Eldika N, Sethi S. 2006. Role of nontypeable *Haemophilus influenzae* in exacerbations and progression of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med*, 12 (2):118-124.
- Erwin AL, Smith AL. 2007. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol*, 15 (8):355-362.
- Esteban A, Popp MW, Vyas VK, Strijbis K, Ploegh HL, Fink GR. 2011. Fungal recognition is mediated by the association of dectin-1 and galectin-3 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (34):14270-14275.
- Evans SE, Xu Y, Tuvim MJ, Dickey BF. 2010. Inducible innate resistance of lung epithelium to infection. *Annu Rev Physiol*, 72:413-435.
- Fan X, Goldfine H, Lysenko E, Weiser JN. 2001. The transfer of choline from the host to the bacterial cell surface requires glpQ in *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol*, 41 (5):1029-1036.
- Farnworth SL, Henderson NC, Mackinnon AC, Atkinson KM, Wilkinson T, Dhaliwal K, Hayashi K, Simpson AJ, Rossi AG, Haslett C, Sethi T. 2008. Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. *Am J Pathol*, 172 (2):395-405.
- Fermino ML, Polli CD, Toledo KA, Liu FT, Hsu DK, Roque-Barreira MC, Pereira-da-Silva G, Bernardes ES, Halbwachs-Mecarelli L. 2011. LPS-induced galectin-3 oligomerization results in enhancement of neutrophil activation. *PLoS One*, 6 (10):e26004.
- Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg BJ, Netea MG, Adema GJ. 2008. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell Microbiol*, 10 (10):2058-2066.
- Fowler M, Thomas RJ, Atherton J, Roberts IS, High NJ. 2006. Galectin-3 binds to *Helicobacter pylori* O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to *H. pylori* adhesion. *Cell Microbiol*, 8 (1):44-54.
- Fradin C, Poulain D, Jouault T. 2000. beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun*, 68 (8):4391-4398.
- Fukao T, Koyasu S. 2003. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol*, 24 (7):358-363.

- Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*, 197 (9):1107-1117.
- Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. 2005. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J*, 24 (6):1277-1286.
- Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. 2009. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9 (7):465-479.
- GOLD. 2013. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) <http://www.goldcopd.org/>.
- Gomez MI, Prince A. 2008. Airway epithelial cell signaling in response to bacterial pathogens. *Pediatr Pulmonol*, 43 (1):11-19.
- Gonzalez-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. 2012. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol*, 12 (2):125-135.
- Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Wevers B, Bruijns SC, Geijtenbeek TB. 2009. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol*, 10 (2):203-213.
- Gross O, Gewies A, Finger K, Schafer M, Sparwasser T, Peschel C, Forster I, Ruland J. 2006. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature*, 442 (7103):651-656.
- Grunebach F, Weck MM, Reichert J, Brossart P. 2002. Molecular and functional characterization of human Dectin-1. *Exp Hematol*, 30 (11):1309-1315.
- Gupta SK, Masinick S, Garrett M, Hazlett LD. 1997. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide binds galectin-3 and other human corneal epithelial proteins. *Infect Immun*, 65 (7):2747-2753.
- Harrison A, Dyer DW, Gillaspay A, Ray WC, Mungur R, Carson MB, Zhong H, Gipson J, Gipson M, Johnson LS, Lewis L, Bakaletz LO, Munson RS, Jr. 2005. Genomic sequence of an otitis media isolate of nontypeable *Haemophilus influenzae*: comparative study with *H. influenzae* serotype d, strain KW20. *J Bacteriol*, 187 (13):4627-4636.
- Henderson IR, Owen P, Nataro JP. 1999. Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol*, 33 (5):919-932.
- Henderson NC, Sethi T. 2009. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev*, 230 (1):160-171.
- Herre J, Marshall AS, Caron E, Edwards AD, Williams DL, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Reis e Sousa C, Gordon S, Brown GD. 2004. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood*, 104 (13):4038-4045.
- Hill DJ, Toleman MA, Evans DJ, Villullas S, Van Alphen L, Virji M. 2001. The variable P5 proteins of typeable and non-typeable *Haemophilus influenzae* target human CEACAM1. *Mol Microbiol*, 39 (4):850-862.

- Hiltke TJ, Schiffmacher AT, Dagonese AJ, Sethi S, Murphy TF. 2003. Horizontal transfer of the gene encoding outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae*, in a patient with chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis*, 188 (1):114-117.
- Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttorp N. 2006. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir Res*, 7:97.
- Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Wang JP, Specht CA, Levitz SM. 2009. Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal beta-glucans and toll-like receptor agonists. *Infect Immun*, 77 (5):1774-1781.
- Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, 3rd, Weiss SJ. 1991. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science*, 254 (5028):99-102.
- John CM, Jarvis GA, Swanson KV, Leffler H, Cooper MD, Huflejt ME, Griffiss JM. 2002. Galectin-3 binds lactosaminylated lipooligosaccharides from *Neisseria gonorrhoeae* and is selectively expressed by mucosal epithelial cells that are infected. *Cell Microbiol*, 4 (10):649-662.
- Jones SA. 2005. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*, 175 (6):3463-3468.
- Jouault T, El Abed-El Behi M, Martinez-Esparza M, Breuilh L, Trinel PA, Chamaillard M, Trottein F, Poulain D. 2006. Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol*, 177 (7):4679-4687.
- Kato A, Schleimer RP. 2007. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*, 19 (6):711-720.
- Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11 (5):373-384.
- Klaile E, Klassert TE, Scheffrahn I, Muller MM, Heinrich A, Heyl KA, Dienemann H, Grunewald C, Bals R, Singer BB, Slevogt H. 2013. Carcinoembryonic antigen (CEA)-related cell adhesion molecules are co-expressed in the human lung and their expression can be modulated in bronchial epithelial cells by non-typable *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, TLR3, and type I and II interferons. *Respir Res*, 14:85.
- Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krotz F, Zahler S, Gloe T, Issbrucker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R. 2003. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest*, 111 (11):1665-1672.
- Kohatsu L, Hsu DK, Jegalian AG, Liu FT, Baum LG. 2006. Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol*, 177 (7):4718-4726.
- Lech M, Susanti HE, Rommele C, Grobmayr R, Gunthner R, Anders HJ. 2012. Quantitative expression of C-type lectin receptors in humans and mice. *Int J Mol Sci*, 13 (8):10113-10131.

- Lee HM, Yuk JM, Shin DM, Jo EK. 2009a. Dectin-1 is inducible and plays an essential role for mycobacteria-induced innate immune responses in airway epithelial cells. *J Clin Immunol*, 29 (6):795-805.
- Lee HM, Shin DM, Choi DK, Lee ZW, Kim KH, Yuk JM, Kim CD, Lee JH, Jo EK. 2009b. Innate immune responses to *Mycobacterium ulcerans* via toll-like receptors and dectin-1 in human keratinocytes. *Cell Microbiol*, 11 (4):678-692.
- Leichtle A, Hernandez M, Lee J, Pak K, Webster NJ, Wollenberg B, Wasserman SI, Ryan AF. 2012. The role of DNA sensing and innate immune receptor TLR9 in otitis media. *Innate Immun*, 18 (1):3-13.
- Lugade AA, Bogner PN, Murphy TF, Thanavala Y. 2011. The role of TLR2 and bacterial lipoprotein in enhancing airway inflammation and immunity. *Front Immunol*, 2:10.
- Maeshima N, Fernandez RC. 2013. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell Infect Microbiol*, 3:3.
- Mantegazza AR, Barrio MM, Moutel S, Bover L, Weck M, Brossart P, Teillaud JL, Mordoh J. 2004. CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human immature dendritic cells. *Blood*, 104 (4):1183-1190.
- Marakalala MJ, Graham LM, Brown GD. 2010. The role of Syk/CARD9-coupled C-type lectin receptors in immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Clin Dev Immunol*, 2010:567571.
- Masoud H, Moxon ER, Martin A, Krajcarski D, Richards JC. 1997. Structure of the variable and conserved lipopolysaccharide oligosaccharide epitopes expressed by *Haemophilus influenzae* serotype b strain Eagan. *Biochemistry*, 36 (8):2091-2103.
- Mathers CD, Loncar D. 2006. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, 3 (11):e442.
- Matsumoto M, Seya T. 2008. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev*, 60 (7):805-812.
- Mayer AK, Dalpke AH. 2007. Regulation of local immunity by airway epithelial cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 55 (6):353-362.
- Melkamu T, Squillace D, Kita H, O'Grady SM. 2009. Regulation of TLR2 expression and function in human airway epithelial cells. *J Membr Biol*, 229 (2):101-113.
- Mey A, Leffler H, Hmama Z, Normier G, Revillard JP. 1996. The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites. *J Immunol*, 156 (4):1572-1577.
- Meyer-Wentrup F, Figdor CG, Ansems M, Brossart P, Wright MD, Adema GJ, van Spriël AB. 2007. Dectin-1 interaction with tetraspanin CD37 inhibits IL-6 production. *J Immunol*, 178 (1):154-162.
- Mizgerd JP. 2008. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med*, 358 (7):716-727.
- Moghaddam SJ, Ochoa CE, Sethi S, Dickey BF. 2011. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 6:113-123.

- Monso E, Ruiz J, Rosell A, Manterola J, Fiz J, Morera J, Ausina V. 1995. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med*, 152 (4 Pt 1):1316-1320.
- Murphy TF. 2003. Respiratory infections caused by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Curr Opin Infect Dis*, 16 (2):129-134.
- Murphy TF. 2006. The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Infect Dis*, 19 (3):225-230.
- Nascimento-Carvalho CM, de Andrade AL. 2006. *Haemophilus influenzae* type b vaccination: long-term protection. *J Pediatr (Rio J)*, 82 (3 Suppl):S109-114.
- Ottenhoff TH. 2012. The knowns and unknowns of the immunopathogenesis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 16 (11):1424-1432.
- Parker D, Prince A. 2011. Type I interferon response to extracellular bacteria in the airway epithelium. *Trends Immunol*, 32 (12):582-588.
- Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. 2002. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax*, 57 (9):759-764.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9):e45.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30 (9):e36.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, 26 (6):509-515.
- Pilette C, Colinet B, Kiss R, Andre S, Kaltner H, Gabius HJ, Delos M, Vaerman JP, Decramer M, Sibille Y. 2007. Increased galectin-3 expression and intra-epithelial neutrophils in small airways in severe COPD. *Eur Respir J*, 29 (5):914-922.
- Plato A, Willment JA, Brown GD. 2013. C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. *Int Rev Immunol*, 32 (2):134-156.
- Preston A, Mandrell RE, Gibson BW, Apicella MA. 1996. The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*, 22 (3):139-180.
- Quattroni P, Li Y, Lucchesi D, Lucas S, Hood DW, Herrmann M, Gabius HJ, Tang CM, Exley RM. 2012. Galectin-3 binds *Neisseria meningitidis* and increases interaction with phagocytic cells. *Cell Microbiol*, 14 (11):1657-1675.
- Rahman I, Adcock IM. 2006. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J*, 28 (1):219-242.
- Rand TG, Sun M, Gilyan A, Downey J, Miller JD. 2010. Dectin-1 and inflammation-associated gene transcription and expression in mouse lungs by a toxic (1,3)-beta-D glucan. *Arch Toxicol*, 84 (3):205-220.

- Reid DM, Gow NA, Brown GD. 2009. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol*, 21 (1):30-37.
- Rincon M, Irvin CG. 2012. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int J Biol Sci*, 8 (9):1281-1290.
- Risberg A, Masoud H, Martin A, Richards JC, Moxon ER, Schweda EK. 1999. Structural analysis of the lipopolysaccharide oligosaccharide epitopes expressed by a capsule-deficient strain of *Haemophilus influenzae* Rd. *Eur J Biochem*, 261 (1):171-180.
- Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, Williams DL, Gordon S, Tybulewicz VL, Brown GD, Reis e Sousa C. 2005. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity*, 22 (4):507-517.
- Rothfuchs AG, Bafica A, Feng CG, Egen JG, Williams DL, Brown GD, Sher A. 2007. Dectin-1 interaction with *Mycobacterium tuberculosis* leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. *J Immunol*, 179 (6):3463-3471.
- Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, Nandi D. 2010. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine*, 50 (1):1-14.
- Schweda EK, Landerholm MK, Li J, Richard Moxon E, Richards JC. 2003. Structural profiling of lipopolysaccharide glycoforms expressed by non-typeable *Haemophilus influenzae*: phenotypic similarities between NTHi strain 162 and the genome strain Rd. *Carbohydr Res*, 338 (23):2731-2744.
- Sethi S, Muscarella K, Evans N, Klingman KL, Grant BJ, Murphy TF. 2000. Airway inflammation and etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest*, 118 (6):1557-1565.
- Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF. 2002. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 347 (7):465-471.
- Sethi S, Wrona C, Grant BJ, Murphy TF. 2004. Strain-specific immune response to *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 169 (4):448-453.
- Shin DM, Yang CS, Yuk JM, Lee JY, Kim KH, Shin SJ, Takahara K, Lee SJ, Jo EK. 2008. *Mycobacterium abscessus* activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1. *Cell Microbiol*, 10 (8):1608-1621.
- Shuto T, Xu H, Wang B, Han J, Kai H, Gu XX, Murphy TF, Lim DJ, Li JD. 2001. Activation of NF-kappa B by nontypeable *Haemophilus influenzae* is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha /beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (15):8774-8779.
- Slack MP, Azzopardi HJ, Hargreaves RM, Ramsay ME. 1998. Enhanced surveillance of invasive *Haemophilus influenzae* disease in England, 1990 to 1996: impact of conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J*, 17 (9 Suppl):S204-207.
- Slevogt H, Maqami L, Vardarowa K, Beermann W, Hocke AC, Eitel J, Schmeck B, Weimann A, Opitz B, Hippenstiel S, Suttrop N, N'Guessan PD. 2008a. Differential

- regulation of *Moraxella catarrhalis*-induced interleukin-8 response by protein kinase C isoforms. *Eur Respir J*, 31 (4):725-735.
- Slevogt H, Zabel S, Opitz B, Hocke A, Eitel J, N'Guessan P D, Lucka L, Riesbeck K, Zimmermann W, Zweigner J, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N, Singer BB. 2008b. CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat Immunol*, 9 (11):1270-1278.
- St Geme JW, 3rd. 2002. Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion. *Cell Microbiol*, 4 (4):191-200.
- Stampfli MR, Anderson GP. 2009. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol*, 9 (5):377-384.
- Steele C, Marrero L, Swain S, Harmsen AG, Zheng M, Brown GD, Gordon S, Shellito JE, Kolls JK. 2003. Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med*, 198 (11):1677-1688.
- Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, Kolls JK, Brown GD. 2005. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog*, 1 (4):e42.
- Sun WK, Lu X, Li X, Sun QY, Su X, Song Y, Sun HM, Shi Y. 2012. Dectin-1 is inducible and plays a crucial role in *Aspergillus*-induced innate immune responses in human bronchial epithelial cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31 (10):2755-2764.
- Swords WE, Buscher BA, Ver Steeg I K, Preston A, Nichols WA, Weiser JN, Gibson BW, Apicella MA. 2000. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol*, 37 (1):13-27.
- Swords WE, Ketterer MR, Shao J, Campbell CA, Weiser JN, Apicella MA. 2001. Binding of the non-typeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide to the PAF receptor initiates host cell signalling. *Cell Microbiol*, 3 (8):525-536.
- Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, Haynes K, Steele C, Botto M, Gordon S, Brown GD. 2007. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol*, 8 (1):31-38.
- Underhill DM, Rossnagle E, Lowell CA, Simmons RM. 2005. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood*, 106 (7):2543-2550.
- Valera I, Fernandez N, Trinidad AG, Alonso S, Brown GD, Alonso A, Crespo MS. 2008. Costimulation of dectin-1 and DC-SIGN triggers the arachidonic acid cascade in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 180 (8):5727-5736.
- van Schilfgaarde M, Eijk P, Regelink A, van Ulsen P, Everts V, Dankert J, van Alphen L. 1999. *Haemophilus influenzae* localized in epithelial cell layers is shielded from antibiotics and antibody-mediated bactericidal activity. *Microb Pathog*, 26 (5):249-262.
- Vasta GR, Ahmed H, Nita-Lazar M, Banerjee A, Pasek M, Shridhar S, Guha P, Fernandez-Robledo JA. 2012. Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox. *Front Immunol*, 3:199.

- Viriyakosol S, Fierer J, Brown GD, Kirkland TN. 2005. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun*, 73 (3):1553-1560.
- Weck MM, Appel S, Werth D, Sinzger C, Bringmann A, Grunebach F, Brossart P. 2008. hDectin-1 is involved in uptake and cross-presentation of cellular antigens. *Blood*, 111 (8):4264-4272.
- WHO. 2008. World Health Organisation (WHO): World Health Statistics. <http://www.who.int/whosis/whostat/2008/en/>.
- Wieland CW, Florquin S, Maris NA, Hoebe K, Beutler B, Takeda K, Akira S, van der Poll T. 2005. The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable *Haemophilus influenzae* from the mouse lung. *J Immunol*, 175 (9):6042-6049.
- Wieland CW, Florquin S, van der Poll T. 2010. Toll-like receptor 9 is not important for host defense against *Haemophilus influenzae*. *Immunobiology*, 215 (11):910-914.
- Willment JA, Gordon S, Brown GD. 2001. Characterization of the human beta -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem*, 276 (47):43818-43823.
- Willment JA, Marshall AS, Reid DM, Williams DL, Wong SY, Gordon S, Brown GD. 2005. The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol*, 35 (5):1539-1547.
- Xie J, Sun M, Guo L, Liu W, Jiang J, Chen X, Zhou L, Gu J. 2006. Human Dectin-1 isoform E is a cytoplasmic protein and interacts with RanBPM. *Biochem Biophys Res Commun*, 347 (4):1067-1073.
- Yadav M, Schorey JS. 2006. The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood*, 108 (9):3168-3175.
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 31 (13):3406-3415.

11 Anhang

11.1 Nukleotid-Sequenzen der in NHBE-Zellen identifizierten Dectin-1 *Splicing*-Varianten

Tabelle 29 Sequenzierungsergebnisse der in NHBE-Zellen identifizierten Dectin-1-*Splicing*-Varianten

Bande 1	
Nukleotid-sequenz	TTCAGGGGCTCTCAAGAACAATGGAATATCATCCTGATTAGAAAATTTGGATGAAGATGGATATAC TCAATTACACTTCGACTCTCAAAGCAATACCAGGATAGCTGTTGTTTCAGAGAAAGGATCGTGTGCTG CATCTCCTCCTTGGCGCCTCATTGCTGTAATTTTGGGAATCCTATGCTTGGTAATACTGGTGATAGCTG TGGTCCTGGGTACCATGGCTATTTGGAGATCCAATTCAGGAAGCAACACATTGGAGAATGGCTACTTT CTATCAAGAAATAAAGAGAACACAGTCAACCCACACAATCATCTTTAGAAGACAGTGTGACTCCTA CCAAAGCTGTCAAAACCACAGGGGTTCTTTCCAGCCCTTGTCTCCTAATTGGATTATATATGAGAAG AGCTGTTATCTATTTCAGCATGTCACATAAATTCCTGGGATGGAAGTAAAAGACAATGCTGGCAACTGG GCTCTAATCTCCTAAAGATAGACAGCTCAAATGAATTGGATTATAGTAAAACAAGTGTCTCCCAA CCTGATAATTCATTTGGATAGGCCTTTCTCGGCCCCAGACTGAGGTACCATGGCTCTGGGAGGATGG ATCAACATTCTCTTCTAACTTATTTTCAGATCAGAACCACAGCTACCCAAGAAAACCCATCTCCAAATT GTGTATGGATTACGTGTGAGTCATTTATGACCAACTGTGTAGTGTGCCCTCA
Produktlänge	731 bp
Anmerkungen	100 % Übereinstimmung mit <i>Splicing</i> -Variante Dectin-1A (Referenz: Ensembl CLEC7A-013; NCBI NM_197947.2)
Bande 2	
Nukleotid-sequenz	TTCAGGGGCTCTCAAGAACAATGGAATATCATCCTGATTAGAAAATTTGGATGAAGATGGATATAC TCAATTACACTTCGACTCTCAAAGCAATACCAGGATAGCTGTTGTTTCAGAGAAAGGATCGTGTGCTG CATCTCCTCCTTGGCGCCTCATTGCTGTAATTTTGGGAATCCTATGCTTGGTAATACTGGTGATAGCTG TGGTCCTGGGTACCATGGGGTTCTTTCCAGCCCTTGTCTCCTAATTGGATTATATATGAGAAGAGC TGTTATCTATTTCAGCATGTCACATAAATTCCTGGGATGGAAGTAAAAGACAATGCTGGCAACTGGGCTC TAATCTCCTAAAGATAGACAGCTCAAATGAATTGAGTCTCACTCTGTTGCCCAAGCTAGAGTGCAGT GAAGCCGCGACATCCCAGGCTCAAGTGATCCTCCCACTCAGCTTCCTGAGTACGGATTATAGTAA AACAAGTGTCTTCCCAACCTGATAATTCATTTTGGATAGGCCTTTCTCGGCCCCAGACTGAGGTACCA TGGCTCTGGGAGGATGGATCAACATTCTTCTAACTTATTTTCAGATCAGAACCACAGCTACCCAAGA AAACCCATCTCCAAATTGTGTATGGATTACGTGTGAGTCATTTATGACCAACTGTGTAGTGTGCCCT CA
Produktlänge	680 bp
Aminosäure-sequenz von Start- bis Stopp-Codon	MEYHPDLENLDEDEGYTQLHFDSQSNTRIAVVSEKGSAAASPPWRLIAVILGILCLVILVIAVVL GTMGVLSSPCPPNWIIYEKSCYLFMSLSWDGSKRQCWQLGSNLLKIDSSNELSLTLLPKLE CSEAATSQAQVILPPQLPE*
Anmerkungen	Exon3 fehlt hier. Ansonsten stimmt die Sequenz bis zum Stopp-Codon mit der von <i>Splicing</i> -Variante Dectin-1G (Referenz: Ensembl CLEC7A-006) überein. Weitere Unterschiede zwischen beiden Varianten ergeben sich erst wieder hinter dem Stopp-Codon.

Bande 3	
Nukleotid-sequenz	TTCAGGGGCTCTCAAGAACAAATGGAATATCATCCTGATTAGAAAATTTGGATGAAGATGGATATAC TCAATTACACTTCGACTCTCAAAGCAATACCAGGATAGCTGTTGTTTCAGAGAAAGGATCGTGTGCTG CATCTCCTCCTTGGCGCCTCATTGCTGTAATTTTGGGAATCCTATGCTTGGTAATACTGGTGATAGCTG TGGTCCTGGGTACCATGGGGGTTCTTTCCAGCCCTTGTCCTCCTAATTGGATTATATATGAGAAGAGC TGTTATCTATTACAGCATGTCATAAATTCCTGGGATGGAAGTAAAAGACAATGCTGGCAACTGGGCTC TAATCTCCTAAAGATAGACAGCTCAAATGAATTGGGATTTATAGTAAAACAAGTGTCTTCCCAACCTG ATAATTCATTTGGATAGGCCTTCTCGGCCCCAGACTGAGGTACCATGGCTCTGGGAGGATGGATCA ACATTCTCTTCTAACTTATTTAGATCAGAACACAGCTACCCAAGAAAACCCATCTCCAAATTGTGT ATGGATTACGTGTCAGTCATTTATGACCAACTGTGTAGTGTGCCCTCA
Produktlänge	593 bp
Anmerkungen	100 % Übereinstimmung mit <i>Splicing</i> -Variante Dectin-1B (Referenz: Ensembl CLEC7A-001; NCBI NM_022570.4)
Bande 4	
Nukleotid-sequenz	TTCAGGGGCTCTCAAGAACAAATGGAATATCATCCTGATTAGAAAATTTGGATGAAGATGGATATAC TCAATTACACTTCGACTCTCAAAGCAATACCAGGATAGCTGTTGTTTCAGAGAAAGGATCGTGTGCTG CATCTCCTCCTTGGCGCCTCATTGCTGTAATTTTGGGAATCCTATGCTTGGTAATACTGGTGATAGCTG TGGTCCTGGGTACCATGGGGGTTCTTTCCAGCCCTTGTCCTCCTAATTGGATTATATATGAGAAGAGC TGTTATCTATTACAGCATGTCATAAATTCCTGGGATGGAAGTAAAAGACAATGCTGGCAACTGGGCTC TAATCTCCTAAAGATAGACAGCTCAAATGAATTGAGTCTCACTCTGTTGCCCAAGCTAGAGTGCAGT GAAGCCGCGACATCCCAGGCTCAAGTGATCTCCACCTCAGCTTCTGAGTATTTCAGATCAGA ACCACAGCTACCCAAGAAAACCCATCTCCAAATTGTGTATGGATTACGTGTCAGTCATTTATGACCA ACTGTGTAGTGTGCCCTCA
Produktlänge	561 bp
Aminosäure-sequenz von Start- bis Stopp-Codon	MEYHPDLENLDEDGYTQLHFDSQSNTRIAVVSEKGSAAASPPWRLIAVILGILCLVILVIAVVL GTMGVLSSPCPPNWIIEKSCYLFMSLSWDGSKRQCWQLGSNLLKIDSSNELSLTLLPKLE CSEAATSQAQVILPPQLPE*
Anmerkungen	Bis zum Stopp-Codon ist die Nukleotid-Sequenz identisch zu der von Bande 2. Anschließend fehlt ein Exon, dann sind sie wieder identisch.
Bande 5	
Nukleotid-sequenz	TTCAGGGGCTCTCAAGAACAAATGGAATATCATCCTGATTAGAAAATTTGGATGAAGATGGATATAC TCAATTACACTTCGACTCTCAAAGCAATACCAGGATAGCTGTTGTTTCAGAGAAAGGATCGTGTGCTG CATCTCCTCCTTGGCGCCTCATTGCTGTAATTTTGGGAATCCTATGCTTGGTAATACTGGTGATAGCTG TGGTCCTGGGTACCATGGGGGTTCTTTCCAGCCCTTGTCCTCCTAATTGGATTATATATGAGAAGAGC TGTTATCTATTACAGCATGTCATAAATTCCTGGGATGGAAGTAAAAGACAATGCTGGCAACTGGGCTC TAATCTCCTAAAGATAGACAGCTCAAATGAATTGATTTCAGATCAGAACACAGCTACCCAAGAAAA CCCATCTCCAAATTGTGTATGGATTACGTGTCAGTCATTTATGACCAACTGTGTAGTGTGCCCTCA
Produktlänge	474 bp
Anmerkungen	100 % Übereinstimmung mit <i>Splicing</i> -Variante Dectin-1D (Referenz: Ensembl CLEC7A-012; NCBI NM_197949.2)

In den Nukleotidsequenzen sind verschiedene Exons alternierend in schwarz und grau dargestellt.

TAG = Stoppcodon

11.2 Danksagung

Zuallererst gilt mein Dank Prof. Dr. Hortense Slevogt, die dieses Projekt zur Verfügung gestellt hat und die auch in schwierigen Phasen stets hinter dem Projekt und hinter mir gestanden und mich unterstützt hat. Ich bedanke mich auch sehr herzlich bei Prof. Dr. Peter Zipfel, der so freundlich war die Zweitbetreuung meiner Arbeit zu übernehmen. Mein besonderer Dank gilt Dr. Turhan Keleş, ohne dessen außergewöhnliches Engagement meine Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Patienten, die einverstanden waren, Proben ihrer Lungensektionen zur Verfügung zu stellen. Prof. Dr. Dr. Robert Bals, Prof. Dr. Hendrik Dienemann und Dr. Christiane Grünewald haben durch die Bereitstellung der Lungensektionen einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. Ebenso PD. Dr. Bernhard B. Singer (Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen, Hufelandstraße 5, 45147 Essen), der die immunhistologische Färbung der Lungenschnitte durchgeführt hat. Ihnen allen danke ich sehr.

Ich bedanke mich bei Dr. Tilman E. Klassert, der alle Fragen zur Molekularbiologie und Statistik mit mir erörtert hat und mich doch noch überzeugen konnte, dass Genetik schön ist. Auch Dr. Mario M. Müller hat sich stets die Zeit genommen all meine Fragen zu beantworten und Ergebnisse mit mir zu diskutieren, wofür ich mich hiermit bedanken möchte. Bei Annina Heinrich bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft, die anregenden Diskussionen und die erholsamen Chai-Latte-Pausen. Ich bedanke mich auch herzlich bei Frauke Schreiber und Simone Tänzer, die stets eine helfende Hand für mich übrig hatten, wenn die Arbeit für zwei Hände zu viel wurde. Für anregende Diskussionen danke ich Dr. Esther Klaile. Julia Müller danke ich für ihre technische Unterstützung. Bei Dr. Ulla Frischmann bedanke ich mich für die gewissenhafte Durchsicht dieser Arbeit auf Rechtschreibung, Formatierung und Interpunktion. Dem gesamten „Host Septomics“ Team gilt mein Dank, dass es mit seiner Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft ein so gutes Arbeitsklima geschaffen hat, so dass auch stressige Situationen und Fehlschläge leichter auszuhalten waren.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die nicht nur mein Studium finanziert haben sondern darüber hinaus, wie auch meine Schwester, immer für mich da waren und sind und deren seelisch-moralische Unterstützung für mich von unschätzbarem Wert ist.

11.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Hortense Slevogt (Betreuung des Projekts), Dr. Tilman E. Klassert (Hilfestellung bei der Statistik), Dr. Esther Klaile (Korrekturlesen des Manuskripts), Dr. Ulla Frischmann (Korrekturlesen des Manuskripts),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für die staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers